

Biosynthese von Kaffeesäuremetaboliten  
im Ackerhornmoos *Anthoceros agrestis* und  
im Kleinen Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Soheil Pezeshki  
aus Mekka/Saudi-Arabien

Marburg/Lahn 2016

---

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation am 06.01.2016 angenommen.

Erstgutachterin: Prof. Dr. Maike Petersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan Rensing

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2016

Hochschulkennziffer 1180

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

# ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Biosynthese von Kaffeesäuremetaboliten im Ackerhornmoos *Anthoceros agrestis* und im Kleinen Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens***

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 06.01.2016

# Danksagung

*Wissen gleicht den Flügeln für des Menschen Leben, einer Leiter für seinen Aufstieg.  
Es ist jedermanns Pflicht, sich Wissen zu erwerben. -Bahá'u'lláh-*

Hiermit möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Maike Petersen für ihre Betreuung meiner Arbeit bedanken. Die wissenschaftlichen Gespräche und Dein offenes Ohr für die kleinen Belange haben meine Zeit in Deinem Arbeitskreis sehr bereichert und werden mir sehr fehlen.

Prof. Stefan Rensing danke ich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur und die Anregungen auf dem Gebiet der Bryologie.

Ich bedanke mich bei den derzeitigen und ehemaligen Gruppenmitgliedern im Arbeitskreis Petersen für ihre Unterstützung und Hilfe, bei Marie-Claire Badouin, Elke Bauerbach, Tobias Busch, Agus Chahyadi, Dr. Anne Döring, Lennart Poppe, Simona Riedel, Jennifer Robinson, Victoria Werner, Julia Wohl und besonders bei Stefan Wolters, der mir mit Rat und Tat sowie mit guten Tipps und Tricks zur Seite stand und mir so einen guten Einstieg in die Arbeit eröffnete.

Den ehemaligen Gruppenmitgliedern des Arbeitskreises Petersen, Dr. Stephanie Hücherig, Dr. Marion Sander und Dr. Corinna Weitzel, fühle ich mich, obwohl ich sie nicht mehr im Labor miterlebt habe, zu tiefster Bewunderung und Dank für ihre, für mich persönlich, maßgeblichen Arbeiten zur Rosmarinsäurebiosynthese in Lamiaceen bewegt.

Den festangestellten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Pharmazeutische Biologie und den ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen vom Arbeitskreis Li danke ich für die schöne Atmosphäre.

Ich danke meinen Eltern, Aghdas Vahedi und Saeid Pezeshki, und meiner Familie insgesamt, dass sie mich ermutigt und unterstützt haben, meine wissenschaftlichen Ziele zu verfolgen und meine Potentiale zu entwickeln.

# Moos

Siegfried von Vegesack

Hast du schon jemals Moos gesehen?  
nicht bloß  
so im Vorübergehen,  
so nebenbei von obenher,  
so ungefähr –  
nein, dicht vor Augen, hingekniet,  
wie man sich eine Schrift besieht?  
O Wunderschrift! O Zauberzeichen!  
Da wächst ein Urwald ohnegleichen  
und wuchert wild und wunderbar  
im Tannendunkel Jahr für Jahr,  
mit krausen Fransen, spitzen Hütchen,  
mit silbernen Trompetentütchen,  
mit wirren Zweigen, krummen Stöckchen,  
mit Sammethärchen, Blütenglöckchen,  
und wächst so klein und ungesehen –  
ein Hümpel Moos.  
Und riesengroß  
die Bäume stehen...

Doch manchmal kommt es wohl auch vor,  
dass sich ein Reh hierher verlor,  
sich unter diese Zweige bückt,  
ins Moos die spitzen Füße drückt,  
und dass ein Has' vom Fuchs gehetzt,  
dies Moos mit seinem Blute netzt...  
Und schnaufend kriecht vielleicht hier auch  
ein sammetweicher Igelbauch,  
indes der Ameis' Karawanen  
sich unentwegt durchs Dickicht bahnen.  
Ein Wiesel pfeift - ein Sprung und Stoß –  
und kalt und groß  
gleitet die Schlange durch das Moos...  
Wer weiß, was alles hier geschieht,  
was nur das Moos im Dunkeln sieht:  
Gier, Liebesbrunst und Meuchelmord –  
kein Wort verrät das Moos.  
Und riesengroß die Bäume stehen –  
Hast du schon jemals Moos gesehen?

## PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

Publikationen	Seifert, J.; Pezeshki, S.; Kamal, A.; Weisz, K. Inter- and intrastrand DNA crosslinks by 2-fluoro-substituted pyrrolobenzodiazepine dimers: stability, stereochemistry and drug orientation, <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2012, 10, 6850-6860
Vorträge	Biosynthesis of caffeic acid derivatives in bryophytes, 1 <sup>st</sup> Eduard Strasburger-Workshop of the German Botanical Society, Nürnberg, 2014  Secondary metabolites in early land plants: Rosmarinic acid production of the hornwort <i>Anthoceros agrestis</i> , Botanikertagung, Tübingen, 2013  Rosmarinic acid synthesis in the hornwort <i>Anthoceros agrestis</i> , Doktorandenseminar der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Hildesheim, 2012
Posterpräsentationen	<i>Anthoceros agrestis</i> : A hornwort that produces rosmarinic acid and other caffeic acid derivatives, 1 <sup>st</sup> European conference on natural products, Frankfurt, 2013  Rosmarinic acid biosynthesis in the hornwort <i>Anthoceros agrestis</i> , Botanikertagung, Berlin, 2011

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis .....	1
II.	Abkürzungen.....	6
III.	Einleitung.....	9
A.	Morphologie, Physiologie und Phylogenie der Moose .....	9
B.	Studienobjekte .....	13
1.	Ackerhornmoos <i>Anthoceros agrestis</i> .....	13
2.	Kleines Blasenmützenmoos <i>Physcomitrella patens</i> .....	14
3.	Zellkulturen.....	14
C.	Sekundärstoffwechsel der Moose.....	16
D.	Polyphenolstoffwechsel von <i>Anthoceros agrestis</i> und <i>Physcomitrella patens</i> .....	18
1.	Rosmarinsäurebiosynthese .....	21
a)	Phenylalanin Ammoniak-Lyase.....	23
b)	Cinnamat 4-Hydroxylase .....	24
c)	4-Cumarat:Coenzym A Ligase .....	24
d)	Tyrosin Aminotransferase .....	25
e)	Hydroxyphenylpyruvatreduktase .....	26
f)	Rosmarinsäure Synthase .....	26
g)	3- und 3'-Hydroxylasen.....	26
E.	BAHD Acyltransferasen .....	27
1.	Hydroxycinnamoyltransferasen .....	28
a)	Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase.....	28
b)	Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase .....	29
c)	Weitere Hydroxycinnamoyltransferasen .....	30
F.	Weitere Acylierungsreaktionen in Pflanzen .....	31
G.	Ziele dieser Arbeit.....	32
IV.	Material und Methoden .....	33
A.	Pflanzliche Zellkulturen .....	33
B.	Kulturcharakterisierung.....	33
1.	Bestimmung der Mediumsparameter .....	33
a)	pH-Wert .....	34
b)	Leitfähigkeit .....	34
c)	Zuckergehalt .....	34



2.	Bestimmung des Wassergehalts und des Trockengewichts.....	34
3.	Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts .....	34
a)	HPLC-Analyse und Berechnung des Rosmarinsäuregehalts .....	34
4.	Expressionsanalyse .....	35
C.	Methoden der Enzymologie .....	35
1.	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial.....	35
2.	Ammoniumsulfat-Fällung .....	35
3.	Aceton-Pulver-Extraktion .....	36
4.	Extraktion heterologer Proteine aus gentechnisch veränderten <i>E. coli</i> .....	36
5.	Affinitätsaufreinigung über Polyhistidin-Tag.....	36
6.	Größenausschlusschromatographie über PD-10 Säulen (Entsalzung).....	37
7.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	37
8.	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
9.	Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	39
a)	Phenylalanine Ammoniak-Lyase (PAL) .....	39
b)	4-Cumarat:Coenzym A Ligase (4CL).....	39
c)	Tyrosin Aminotransferase (TAT) .....	40
d)	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) .....	40
e)	Hydroxycinnamoyltransferasen (HCT).....	41
(1)	Synthese von Caffeoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA.....	43
(2)	Extraktion von Caffeoyl-Glucose .....	44
(3)	HCT-Test mit Ellmans Reagenz .....	46
10.	Kinetische Messungen.....	46
11.	HPLC-Analyse von Enzymreaktionsprodukten .....	47
D.	Methoden der Molekularbiologie .....	49
1.	Extraktion von RNA aus Pflanzenkulturen.....	49
2.	Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA .....	49
3.	Extraktion von gDNA .....	50
4.	Agarose-Gelelektrophorese .....	50
5.	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern .....	50
a)	CODEHOP PCR .....	52
6.	Gelextraktion über Siliciumdioxidsäulen.....	52
7.	Restriktionsverdau .....	53
8.	Ligation in Vektoren .....	53
a)	TA-Ligation.....	53

b) T4-Ligation .....	54
9. RACE PCR .....	54
a) Klassische RACE PCR .....	54
(1) 3'-RACE PCR .....	54
(2) 5'-RACE PCR .....	56
b) RLM RACE .....	57
c) SMART RACE .....	58
(1) In-Fusion Klonierung von SMARTer RACE-Produkten .....	59
10. Inverse PCR .....	59
11. RAGE-PCR .....	60
12. Southern Blot und Kolonie Hybridisierung .....	61
13. gDNA- und Kolonie-PCR .....	62
14. PCR mit Volllängenprimern .....	63
15. Fusions-PCR .....	64
16. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	65
17. Erstellung phylogenetischer Stammbäume .....	66
E. Methoden der Gentechnologie .....	67
1. Medien .....	67
a) Festes und flüssiges LB-Medium .....	67
b) Flüssiges TB-Medium .....	67
c) SOC-Medium .....	67
2. Erstellung von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Kulturen .....	68
3. Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> und Ausplattieren auf LB-Agarplatten .....	68
a) Transformation von Stellar Zellen .....	68
4. Anlegen von Übernachtskulturen und Glyceroldauerkulturen .....	69
5. Plasmidpräparation .....	69
6. Umklonierung in Expressionsprimer .....	69
7. Synthese heterologer Proteine .....	70
F. Primerliste .....	70
1. Primer für <i>Anthoceros agrestis</i> .....	70
a) Genexpressionsprimer/qRT PCR Primer .....	70
b) Volllängenprimer/Proteinexpressionsprimer .....	70
c) Degenerierte und genspezifische Primer für HCT 1 .....	72
d) Genspezifische Primer für HCT 2 .....	72
e) Genspezifische Primer für HCT 3 .....	73

f)	Genspezifische Primer für HCT 4 .....	73
g)	Degenerierte und genspezifische Primer für PAL .....	73
h)	Degenerierte Primer für TAT .....	74
2.	Weitere/Andere Primer .....	74
a)	Primer für konservierte Bereiche von HCTs aus Lamiaceae .....	74
b)	RACE-PCR Primer nach Scotto-Lavino et al. ....	74
3.	Primer für <i>Physcomitrella patens</i> .....	75
a)	Volllängenprimer/Expressionsprimer für HCTs 1-5 .....	75
b)	Sequenzierprimer .....	75
G.	Vektorkarten .....	75
1.	pDrive .....	76
2.	pET-15b .....	77
3.	pGEM-4Z .....	78
4.	pRACE .....	79
5.	pRSET-C .....	80
H.	Genotypen der <i>E. coli</i> Laborstämme .....	81
1.	EZ .....	81
2.	Stellar .....	81
3.	SoluBL21 .....	81
I.	Molekularbiologische Reagenzien und Kits .....	81
J.	Chemikalienliste .....	81
K.	Geräte und Verbrauchsmaterial .....	83
V.	Ergebnisse und Diskussion .....	86
A.	Kulturverlauf von Suspensionskulturen von <i>Anthoceros agrestis</i> .....	86
1.	Mediumsparameter .....	87
2.	Wachstumsparameter .....	88
3.	Gehalt an Rosmarinsäure und Rosmarinsäureglycosid .....	88
B.	Identifikation von Genen der Rosmarinsäurebiosynthese in <i>Anthoceros agrestis</i> .....	91
1.	Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) .....	93
a)	Phylogenetische Einordnung der PAL .....	96
2.	Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs) .....	99
a)	HCT 1 .....	99
(1)	Strukturvorhersage für AaHCT1 .....	103
b)	HCT 2 .....	103
(1)	Strukturvorhersage für AaHCT2 .....	106

c)	HCT 3 .....	108
d)	HCT 4 .....	110
e)	HCT 5 .....	111
(1)	Strukturvorhersage für AaHCT5 .....	114
f)	Phylogenetische Einordnung der HCTs .....	115
3.	Tyrosin Aminotransferase (TAT) .....	118
C.	Charakterisierung der Enzyme der Rosmarinsäurebiosynthese in <i>Anthoceros agrestis</i> .....	118
1.	Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) .....	118
a)	Enzymaktivität der PAL im Kulturverlauf .....	118
b)	Expression des PAL 2-Gens im Kulturverlauf .....	120
c)	Kinetische Parameter der PAL .....	122
2.	Tyrosin Aminotransferase (TAT) .....	124
a)	Enzymaktivität der TAT im Kulturverlauf .....	124
b)	Kinetische Parameter der TAT .....	126
3.	Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs) .....	128
a)	Aktivitätstest der HCTs .....	128
b)	Heterologe Expression von HCTs in <i>E. coli</i> .....	131
c)	Expression der HCTs im Kulturverlauf .....	134
4.	Andere Enzyme .....	136
D.	Charakterisierung von Hydroxycinnamoyltransferasen aus <i>Physcomitrella patens</i> .....	136
1.	Auswahl und Amplifizierung von Hydroxycinnamoyltransferasen .....	136
a)	HCT 1 .....	140
b)	HCT 2 .....	142
c)	HCT 3 .....	145
d)	HCT 4 .....	147
e)	HCT 5 .....	149
2.	Expression von Hydroxycinnamoyltransferasen .....	151
3.	Charakterisierung heterolog exprimierter Hydroxycinnamoyltransferasen .....	153
VI.	Zusammenfassung .....	155
VII.	Summary .....	157
VIII.	Referenzen .....	159
IX.	Anhang .....	174

## II. Abkürzungen

### Einheiten und Maße

aa = Aminosäure  
bp = Basenpaar  
 $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient  
g = Erdbeschleunigung  
g = Gramm  
kat = Katal (Mol/Sekunde, Enzymaktivität)  
kb = Kilobase  
kDa = Kilodalton  
 $K_M$  = Michaelis-Menten-Konstante  
M = Molar, mol/l  
 $OD_{600}$  = Optische Dichte bei 600 nm  
s = Sekunde  
S = Sievert  
 $T_M$  = Schmelztemperatur in °C  
U = Units (Enzymaktivität)  
UpM = Umdrehungen pro Minute

### Besondere Chemikalien

CA = Kaffeesäure  
ChA = Chlorogensäure  
DHPL = 3,4-Dihydroxyphenyllactat  
DTT = Dithiothreitol  
KPi = Kaliumphosphatpuffer  
pHPL = 4-Hydroxyphenyllactat  
pHPP = 4-Hydroxyphenylpyruvat  
RA = Rosmarinsäure  
RA-Glc = Rosmarinsäure-3'-O- $\beta$ -D-Glucosid  
MIO-Gruppe = 3,5-Dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-on (autokatalytisch synthetisierte katalytische Einheit in PALs)

### Häufig vorkommende Organismen

Aa = *Anthoceros agrestis*, Ackerhornmoos, Anthocerotaceae  
At = *Arabidopsis thaliana*, Ackerschmalwand, Brassicaceae  
Cb = *Solenostemon scutellarioides*, ehemals *Coleus blumei*, Buntnessel, Lamiaceae  
*E. coli* = *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae  
Mo = *Melissa officinalis*, Zitronenmelisse, Lamiaceae  
Pp = *Physcomitrella patens*, Kleines Blasenmützenmoos, Funariaceae  
Sb = *Sorghum bicolor*, Mohrenhirse, Poaceae  
Ss = *Solenostemon scutellarioides*, ehemals *Coleus blumei*, Buntnessel, Lamiaceae

### Datenbanken und bioinformatische Programme

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

BLOSUM = Blocks Substitution Matrix  
EC = Enzyme commission-Nummer  
EBI = European Bioinformatics Institute  
NCBI = National Center for Biotechnology Information  
PDB = Protein-Datenbank

### Proteine und Gene

CDS = kodierende DNA-Sequenz  
3H/3'H = 3- und 3'-Hydroxylasen  
4CL = 4-Cumarat:Coenzym A Ligase  
Act =  $\alpha$ -Aktin  
BAHD = Superfamilie von Acyltransferasen, Akronym aus den Anfangsbuchstaben der vier Enzyme Benzylalkohol *O*-Acetyltransferase (BEAT), Anthocyan *O*-Hydroxycinnamoyltransferase (AHCT), Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase (HCBT) und Deacetylvindolin 4-*O*-Acetyltransferase (DAT)  
BSA = Bovines Serum Albumin  
C4H = Cinnamat 4-Hydroxylase  
GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase  
HCT = Hydroxycinnamoyltransferase  
HCS/QT = Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase  
HPPR = Hydroxyphenylpyruvat Reduktase  
HQT = Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase  
HST = Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase  
lacZ =  $\beta$ -Galactosidase  
PAL = Phenylalanin Ammoniak-Lyase  
RAS = Rosmarinsäure Synthase, eigentlich Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase  
TAL = Tyrosin Ammoniak-Lyase  
TAT = Tyrosin Aminotransferase, Tyrosin Transaminase

### Nukleotide und Nukleotidketten

A = Adenin  
C = Cytosin  
cDNA = komplementäre DNA  
G = Guanin  
gDNA = genomische DNA  
K = G oder T (Ketogruppe)  
M = A oder C (Aminogruppe)  
mRNA = Boten-RNA  
N = unspezifisches Nukleotid  
R = A oder G (Purin)  
S = G oder C (starke H-Brückenbindung, Strong)  
T = Thymin  
U = Uracil  
W = A oder T (schwache H-Brückenbindung, Weak)  
Y = C oder T (Pyrimidin)

### **Proteinogene Aminosäuren**

A = Alanin (Ala)

C = Cystein (Cys)

D = Aspartat/Asparaginsäure (Asp)

E = Glutamat/Glutaminsäure (Glu)

F = Phenylalanin (Phe)

G = Glycin (Gly)

H = Histidin (His)

I = Isoleucin (Ile)

K = Lysin (Lys)

L = Leucin (Leu)

M = Methionin (Met)

N = Asparagin (Asn)

P = Prolin (Pro)

Q = Glutamin (Gln)

R = Arginin (Arg)

S = Serin (Ser)

T = Threonin (Thr)

V = Valin (Val)

W = Tryptophan (Trp)

X = unspezifische Aminosäure

Y = Tyrosin (Tyr)

### III. Einleitung

#### A. Morphologie, Physiologie und Phylogenie der Moose

Sämtliche heute lebenden Landpflanzen werden unter dem monophyletischen Organisationstyp der Embryophyten zusammengefasst. Der zygotische und embryonale multicelluläre Sporophyt wird in der Mutterpflanze ruhend von dieser versorgt bis er ein gewisses Reifestadium erreicht hat und freigesetzt werden kann. Obschon auch einige Algen der überwiegend Süßwasser bewohnenden Gattungen *Coleochaete* und *Chara* (beide gelten als Schwesterphylum oder sogar mögliche Ahnen der Landpflanzen) dieses Entwicklungsmerkmal rudimentär aufweisen (Haig und Wilczek 2006), ist es ein Charakteristikum der vier landbewohnenden Abteilungen Marchantiophyta, Bryophyta, Anthocerotophyta und Tracheophyta. Die sexuelle Reproduktion der Embryophyten erfolgt durch Befruchtung der Eizellen der weiblichen Archegonien durch Spermatozoide aus den männlichen Antheridien. Die Befruchtung erfordert das Vorhandensein eines Wasserfilms zur chemotaktischen Anlockung der Spermatozoide durch den Archegonienstand. Sowohl die Geschlechtszellen als auch der Embryo sind, anders als bei den Algen und Pilzen, durch sterile Hüllzellen geschützt. Ein weiteres Erkennungsmerkmal der Embryophyten ist der anatomische Aufbau des Vegetationskörpers, der sich bei den Kormophyten in Wurzeln, Spross und Blatt, bei den Moosen in Cauloid, Rhizoid und Phylloid bzw. Thallus und Rhizoid aufteilt. Diese einfache Differenzierung hat im Verlauf der Evolution und Coevolution teils bizarre Formen hervorgebracht, erfüllt jedoch die grundlegenden Aufgaben der Verankerung im Boden und Aufnahme von Wasser und Nährstoffen (Wurzeln oder Rhizoide), Transport und Lichtvorteile (Spross oder Cauloid) sowie Assimilation, Transpiration und Reproduktion (Blätter und Blüten oder Phylloide bzw. Thalli). Der monophyletische Ursprung der Embryophyten lässt sich anhand verschiedener zellulärer und subzellulärer Strukturen sowie chemischer Verbindungen erklären: Embryophyten besitzen als Photosynthesepigmente die Chlorophylle a und b sowie Carotinoide. Stärke ist das primäre Assimilationsprodukt, Cellulose wird für den Zellwandaufbau verwendet. Außer den beiden oben genannten Gattungen der Armleuchteralgen (Charophyta), fehlen diese Merkmale allen anderen Organismen im Pflanzenreich (Kroken et al. 1996). Deshalb werden Charophyten und Embryophyten als Streptophyten zusammengefasst, diese bilden mit den anderen Grünalgen die Gruppe der Viridiplantae bzw. Chloroplastida (Becker und Marin 2009).

Die drei Abteilungen, die man gemeinhin als Moose zusammenfasst (Marchantiophyta (Lebermoose), Bryophyta (Laubmoose), Anthocerotophyta (Hornmoose)), sind eine paraphyletische Gruppe einfacher Landpflanzen. Die Paläobotanik setzt die Entwicklung der Landpflanzen in den Übergang vom mittleren Ordovizium (475 Millionen Jahre vor unserer Zeit (mya)) bis zum frühen Silur (440 mya) (Kenrick und Crane 1997; Villarreal et al. 2010). In diese Zeit, also

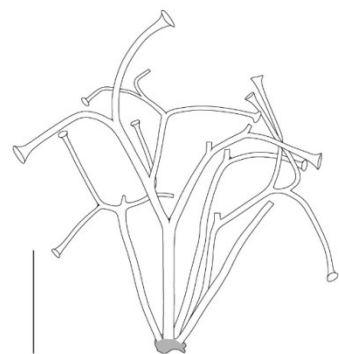


Abbildung 1 Fossil und Rekonstruktion von *Cooksonia* nach Gerienne et al. (2006). Maßstab 1 cm.

relativ zeitnah an die Besiedlung des neuen Lebensraums, muss auch die Auftrennung der vier Abteilungen erfolgt sein (Ligrone et al. 2012b). In diese Epoche und im weiteren Verlauf des Silurs bis



in das mittlere Devon hinein sind zwar Sporen früher Moose erhalten, jedoch kaum deren Makrofossile (Kenrick et al. 2012). Das pflanzliche Leitfossil des Silurs ist *Cooksonia* (Abb. 1, (Gerrienne et al. 2006)), eine zu den Urfarnen zählende fossile Gattung von Gefäßpflanzen von etwa 10 cm Höhe. Damit ist eine Datierung der Entstehung und Differenzierung der einzelnen Abteilungen der Moose schwer über Fossile vermittelbar (Troitsky et al. 2007), sondern muss über DNA-Sequenzvergleiche, der sogenannten Molekularen Uhr, erfolgen (Hedges und Kumar 2009). Dabei wird unter der Annahme, dass Mutationen in Genen über längere Zeiträume gleichmäßig auftreten, anhand der Anzahl und Art der Mutationen der Zeitpunkt der Aufspaltung einer ursprünglichen Art in zwei neue Arten zurückgerechnet. Man erhält einen Stammbaum, der nicht mehr anhand morphologischer Gesichtspunkte erstellt wird, sondern die Mutationen als Basis der Berechnung der Entstehung der Art dienen. Lange Zeit herrschte über die phylogenetische Zuordnung der drei Abteilungen in Bezug zu den Gefäßpflanzen Uneinigkeit, und bis heute noch erfolgen Neuordnungen (Wickett et al. 2014). Nach aktuellem Forschungsstand lässt sich sagen, dass die Lebermoose die älteste Abteilung bilden, gefolgt von den Laubmoosen und schließlich von den Hornmoosen, wobei die Hornmoose die Schwestergruppe der Gefäßpflanzen darstellen (Qiu et al. 2006; Ligrone et al. 2012a; Ruhfel et al. 2014) (Abb. 2-7, Fotos mit freundlicher Unterstützung des Botanischen Gartens Marburg).

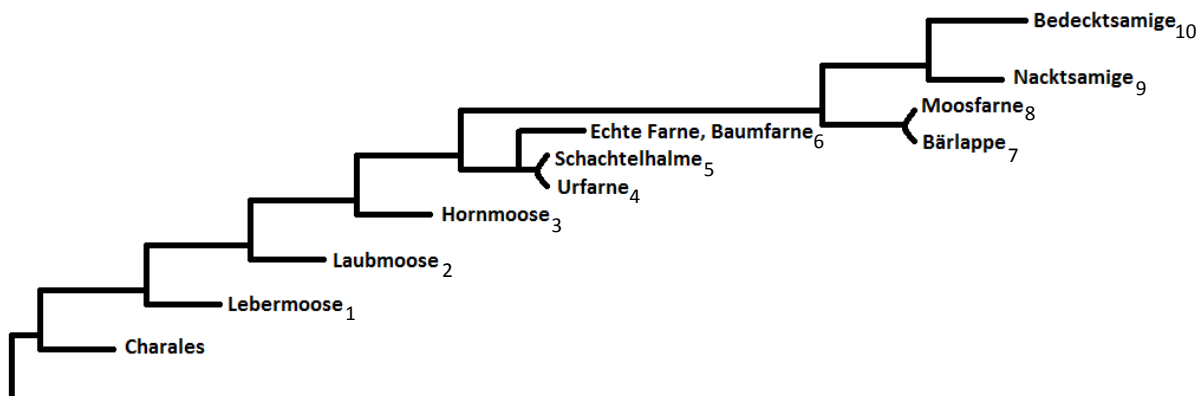


Abbildung 2 Stammbaum der Landpflanzen, vereinfacht nach Ruhfel et al. 2014. Dargestellt sind nur die molekularbiologischen Verwandtschaftsverhältnisse, die Länge der Äste gibt keine zeitlichen Verläufe wieder.



Abbildung 3 Links Lebermoos (1), Mitte und rechts Laubmoose (2).



Abbildung 4 Links Hornmoos (3), Mitte Urfarn (4), rechts Schachtelhalm (5).

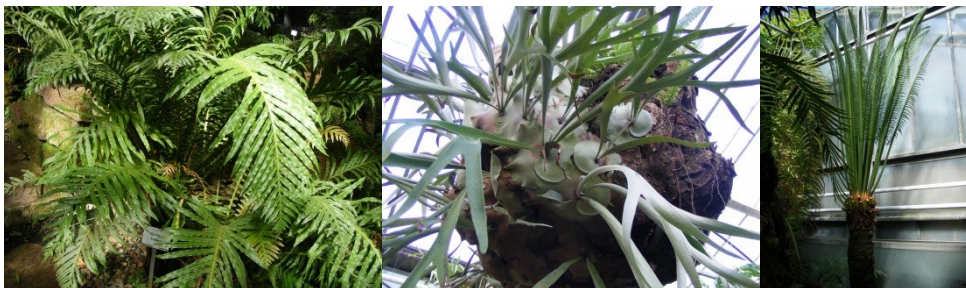


Abbildung 5 Links und Mitte Echte Farne, rechts Baumfarn (6).



Abbildung 6 Links Bärlapp (7), Mitte Moosfarn (8), rechts Nacktsamer (9).

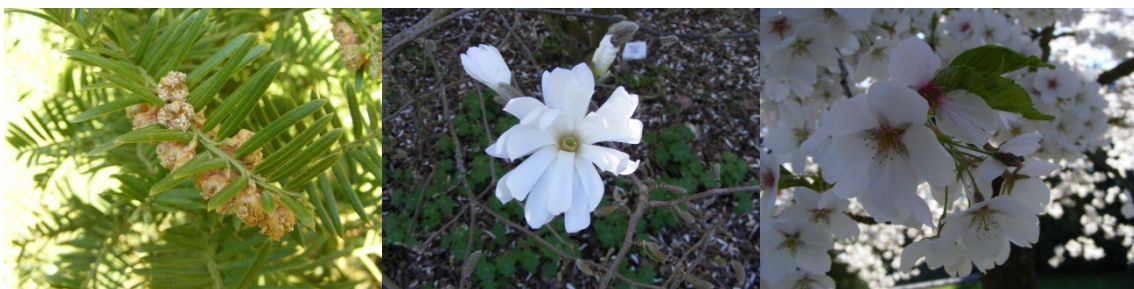


Abbildung 7 Links Nacktsamer (9), Mitte und rechts Bedecksamer (10).

Die anatomische und cytologische Differenzierung der drei Moosabteilungen ist durchaus vielfältig (Tabellen 1 und 2).

**Tabelle 1 Eigenschaften der Gametophyten der drei Moosabteilungen (nach Renzaglia et al. 2000).**

<b>Gametophyt</b>	<b>Lebermoose</b>	<b>Laubmoose</b>	<b>Hornmoose</b>
Aussehen des Gametophyten	Lappige Thalli oder folios (dorsiventral oder radial), differenziert	Folios (radial), differenziert, „bäumchenartig“	Lappige Thalli (dorsiventral), undifferenziert
Aussehen der Apikalzelle	Tetraedrisch, keil- linsen- oder halbkreisförmig	Tetraedrisch, selten linsenförmig	Keilförmig, vereinzelt halbkreisförmig
Frühstadium	Spore bildet Protonema oder Gametophyten	Spore bildet Protonema	Spore bildet Gametophyten
Plastiden/Zelle	Viele; auch Elaioplasten vorhanden	Viele	Ein bis wenige
Pyrenoide	Keine	Keine	Keine bis wenige
<i>Nostoc</i> -Interaktion	Bei zwei Genera bekannt, in sog. Aurikeln, externen Anhängen, eingenistet	Bei <i>Sphagnum</i> beobachtet	Häufig vorkommend, in mit Schleim ummantelten schizogenen Höhlen des Thallus
Pilz-Interaktion	Häufig vorhanden	Keine	Häufig vorhanden
Reproduktive Zellen	Epidermal herauswachsend	Epidermal herauswachsend	Im Thallus versenkt

**Tabelle 2 Eigenschaften der Sporophyten der drei Moosabteilungen (nach Renzaglia et al. 2000).**

<b>Sporophyt</b>	<b>Lebermoose</b>	<b>Laubmoose</b>	<b>Hornmoose</b>
Aussehen des Sporophyten	Kurz, gedrunken	Lang, schmal, Köpfchen am Ende	Lang, schmal, hornförmig
Wachstum	Schnell, begrenzt	Langsam, begrenzt	Langsam, kontinuierlich
Reifung der Sporen	Gleichzeitig	Gleichzeitig	Kontinuierlich
Stomata und Plastiden	Keine Plastiden und echten Stomata	Manchmal vorhanden	Häufig vorhanden
Seta und Kalyptra	Vorhanden	Vorhanden	Keine
Columella	Nicht vorhanden	vorhanden	vorhanden
Elateren	Vorhanden	Keine	Pseudoelateren
Meristem	Nicht vorhanden	Zeitlich begrenzt vorhanden	Vorhanden

Beispielsweise sind die Gametophyten der Laubmoose folios, die der Hornmoose thallos, die Lebermoose können beide Formen annehmen, was dazu geführt hat, dass bis vor wenigen Jahren die Lebermoose in zwei Abteilungen geführt wurden. Diesen Formunterschieden liegen cytologische Ursachen zu Grunde und tatsächlich lassen sich die Apikalzellen der drei Moosabteilungen in vier Gruppen einteilen (tetradrisch, halbkreis-, linsen-, keilförmig), die zu je einem der beiden Gewebestrukturen (folios oder thallos) führen können. Zusätzlich wurde beschrieben, dass ein Formwechsel der Apikalzelle und damit der Gewebestruktur der Pflanze im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung auftreten kann (Renzaglia et al. 2000).

Hornmoose besitzen nur einen oder wenige Chloroplasten pro Zelle, dieser enthält häufig Pyrenoide, Agglomerate aus Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO), die der Kohlenstoffkonzentrierung für die Photosynthese dienen (Smith und Griffiths 1996; Villarreal und Renner 2012). Diese Eigenheit teilen sich Hornmoose nicht mit den anderen Moosen oder höheren Pflanzen sondern nur mit Algen, haben die Pyrenoide jedoch unabhängig von diesen und mehrmals



im Laufe der Evolution entwickelt (Villarreal und Renner 2012). Eine Besonderheit ist ferner die Kompetenz von Hornmoosen, sowohl mit Pilzen als auch mit Cyanobakterien Gemeinschaften zu bilden. Die Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* leben in Höhlungen des Moosthallus, während die Pilzhyphe den Gametophyten durchziehen können (Pierce 1906; Meeks 1998, 1998; Desirò et al. 2013). Ob die Lebensgemeinschaft mit *Nostoc* symbiotischer Natur ist, also zu beiderseitigem Vorteil, wurde in Frage gestellt.

Noch eigentümlicher sind die Strukturen der Sporophyten bei Hornmoosen (Ligrone et al. 2012b). Die Columella der Sporophyten, also der sterile säulenförmige Schaft, hat einen Aufbau, der nur in der archaischen Farnfamilie Psilotaceae wiederzufinden ist (Blaikley 1933). Anders als bei den Laub- und Lebermoosen wächst bei den Hornmoosen der Sporophyt kontinuierlich und entlässt die nacheinander reifenden Sporen. Es ist eine Entwicklung dahingehend beobachtbar, dass der Sporophyt gegenüber dem Gametophyten mit zunehmender Entwicklungsstufe der Abteilung an Bedeutung gewinnt: Während der Sporophyt der Lebermoose kaum alleine überlebt, besitzen Laubmoossporophyten manchmal und Hornmoossporophyten sehr häufig Chloroplasten und Stomata. Abgetrennte Sporophyten von Hornmoosen sind deshalb bei entsprechenden Bedingungen in der Lage, mehrere Wochen zu leben und die Sporen zur Reife zu bringen. Schließlich bildet der Sporophyt der Tracheophyten den wichtigsten Teil des Lebenszyklus, wobei auch hier wiederum der Gametophyt langsam an Bedeutung verliert, was an der Kurzlebigkeit und der geringen Größe der Gametophyten von Samenpflanzen im Vergleich zu Farnen oder Bärlapppflanzen zu erkennen ist.

Gemeinsamkeiten der Moose untereinander sind morphologischer Art: Das Fehlen von Blüten, das Ausbilden nur einer Sporenkapsel auf dem Sporophyten (monosporangisch), ein ausgeprägter Generationswechsel mit dominierendem haploidem Gametophyten gegenüber dem diploiden unverzweigten Sporophyten, das Fehlen von Lignin und damit einhergehend von Leitbündeln und verholztem Gewebe. Dadurch sind alle Moose kleinwüchsige Gewächse.

## **B. Studienobjekte**

### **1. Ackerhornmoos *Anthoceros agrestis***

Das Ackerhornmoos *Anthoceros agrestis*, Familie Anthocerotaceae, gehört zur Abteilung der Anthocerotophyta und zur Klasse Anthocerotopsida. Hornmoose werden in fünf Familien zusammengefasst, wobei die Familie der Anthocerotaceae die Gattungen *Anthoceros*, *Folioceros* und *Sphaerosporoceros* beinhaltet (Duff et al. 2007). Die Hornmoose sind in den Fokus der Phylogenie geraten, da es sich um die Schwesterabteilung der Tracheophyten handelt und somit viele interessante Aspekte der Entwicklungsbiologie erforscht werden können. Erst Ende 2015 wurde die Genomsequenz von *Anthoceros agrestis* veröffentlicht (Szövényi et al. 2015). *Anthoceros agrestis* kommt weltweit in feuchten und hellen Gebieten vor, beispielsweise auf abgeernteten Äckern und in Gärten, üblicherweise auf der Nordhalbkugel im Herbst. Der thallose Gametophyt ist flach und gelappt, der Sporophyt ist bis zu 7 cm groß, dünn und hornförmig (Abb. 8). Die Pflanze ist monözisch. Die Klassifikation der Arten *Anthoceros agrestis*, *Anthoceros crispulus* und *Anthoceros punctatus* ist morphologisch schwierig. Bei der hier untersuchten Art, die aus Kiel von Herrn Prof. Binding stammt (Binding und Mordhorst 1991), handelt es sich nach früherer Einteilung um *Anthoceros crispulus*, nach neueren Untersuchungen um *Anthoceros agrestis*.



Abbildung 8 *Anthoceros agrestis*, Szövényi et al. (2015). Maßstab 2 mm.

## 2. Kleines Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*

Das Kleine Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*, Familie Funariaceae, gehört zur Abteilung der Laubmoose in der Klasse der Bryopsida. Es handelt sich dabei um einen sequenzierten Organismus (Rensing et al. 2008), der spätestens seit Beginn des 21. Jahrhunderts bei Molekularbiologen und Biotechnologen beträchtlich an Interesse gewonnen hat (Schaefer und Zrýd 2001). *Physcomitrella* ist insofern interessant, da es besonders häufig und einfach homologe Rekombination durchführt, wobei das Ausschalten oder Umtauschen von Genen im haploiden Vegetationskörper dazu führt, dass Funktionen in der Entwicklungsbiologie der Pflanze schnell und mitunter makroskopisch beobachtbar sind (sog. Knock-out Moose) (Hohe et al. 2004). Auch können so Organismen für vielfältige Anwendungen geschaffen werden, etwa für Biodegradation von Verschmutzungen in Gewässern oder als Produktionsstämme für Makromoleküle in Bioreaktoren (Reutter und Reski 1996; Decker und Reski 2004; Hohe und Reski 2005; Reski et al. 2015). *Physcomitrella* bildet als Laubmoos ein Protonema der zu einem reifen Gametophor aus Rhizoid, Cauloid und Phylloid ausreift (Abb. 9). Die Apikalzelle ist tetraderisch, der Sporophyt entwickelt sich auf dem Cauloid, die Pflanze ist monözisch (Reski 1998). Es kommt in Nordamerika und Eurasien vor, bewohnt feuchte bis nasse Gebiete, etwa trockene Flussbetten und schlammige Pfützen.



Abbildung 9 *Physcomitrella patens*, Egner et al. (2002). Maßstab 1 mm.

## 3. Zellkulturen

Die untersuchten Pflanzen werden als sterile Kulturen in künstlichen Nährmedien gehalten (Abb. 10-12). Diese Sterilkulturen haben deutliche Vorteile zum Beispiel gegenüber der Sammlung der

Pflanzen aus Wildbeständen oder aus Gewächshäusern (Ramachandra Rao und Ravishankar 2002; Sabovljevic et al. 2009). Die Rezeptur des Mediums bleibt konstant gleich, und durch das regelmäßige Überimpfen in frisches Medium sind die Pflanzen gut versorgt. Ebenso sind andere abiotische Faktoren wie Licht, Temperatur und Wasser geregelt. Das ist besonders bei langsam wachsenden Arten wie etwa Moosen wichtig. Viele Pflanzen stehen unter Naturschutz, und eine Wildsammlung kommt deshalb nicht in Frage. Auch gibt es Arten, die nur zu bestimmten Jahreszeiten vorkommen, so dass auch hier die Wildsammlung kein langfristiges Arbeiten ermöglicht, oder politische Umstände verhindern eine Versorgung des Weltmarkts mit dem getrockneten pflanzlichen Ausgangsmaterial, also mit den Drogen. Durch gezielte Optimierungen des Mediums und der Ernte oder durch molekularbiologische Manipulationen lassen sich die Gehalte und das Spektrum an bestimmten Naturstoffen verändern und ermöglichen so eine kostengünstige Produktion von industriell interessanten Strukturen. Andererseits kann eine Sterilkultur in der Grundlagenforschung im Zuge einer Kulturcharakterisierung nützliche Informationen liefern, um weitergehende Experimente so zu gestalten, dass effektiv gearbeitet werden kann, etwa indem RNA Extraktionen an Tagen erfolgen, an denen der untersuchte Stoffwechselweg aktiv ist. Es gibt allerdings auch Nachteile: Einer sterilen Laborkultur fehlen die biotischen und abiotischen Stressoren wie Fressfeinde, Bestäuber, Infektionen, Trockenheit, UV-Strahlung etc. (Es sei denn, sie wird gezielt mit diesen Elicitoren in Kontakt gebracht). Dadurch ist sie anfälliger für Veränderungen, die ein Ausschalten von Sekundärmetabolismusgenen bewirken können, da der Sekundärmetabolismus der Pflanze Überlebensvorteile gegenüber diesen Stressoren bringt. Fehlen die Stressoren, kann die Pflanze auch ohne Sekundärmetabolite überleben, und man erhält nicht das gewünschte Wirkstoffprofil oder die Menge, wie sie etwa für Arzneipflanzen vorgeschrieben sind. Diese Veränderungen können epigenetischer Art, etwa DNA-Methylierungen, sein oder sogar Mutationen, da der oben genannte Selektionsdruck fehlt. Eine Pflanze aus der Laborkultur könnte so nicht in der freien Natur überleben. Es kann durch die Verwendung des künstlichen Nährmediums Sekundärmetabolite entstehen, die natürlicherweise nicht entstehen und so ein verfälschtes Bild der ökologisch relevanten Metabolite geben. Andererseits sind sterile Kulturen anfällig für Kontaminationen, was schlimmstenfalls zum Verlust der Kultur führt. Auch Gewächshauskulturen können kontaminiert werden. In beiden Fällen ist mitunter der Einsatz von Antibiotika, Fungiziden oder Insektiziden nötig. Bestimmte Naturstoffe sind an das Vorhandensein spezialisierter Zellen gebunden, etwa die ätherischen Öle aus Lamiaceae, die in den Ölschuppen der Blätter hergestellt werden. Fehlen diese Strukturelemente, kann kein oder kaum ätherisches Öl produziert werden (Mulder-Krieger et al. 1988).

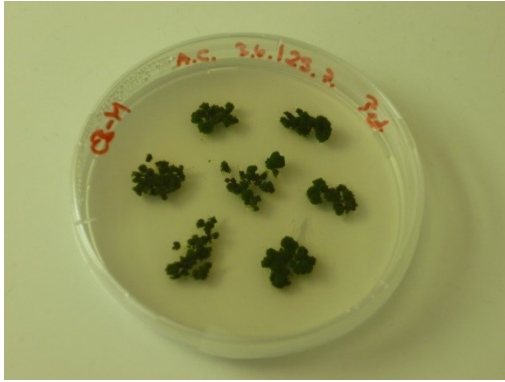


Abbildung 10 Agarkultur von *Anthoceros agrestis*.



Abbildung 11 Suspensionskultur von *Anthoceros agrestis*.



Abbildung 12 Agarkultur von *Physcomitrella patens*.

### C. Sekundärstoffwechsel der Moose

Moose sind hinsichtlich der niedermolekularen Naturstoffe eine wenig erforschte Gruppe. Von den geschätzten 24.000 Moosarten werden etwa 150 hauptsächlich in den chinesischen, indischen, schamanischen und indianischen Kulturen in der Ethnomedizin angewendet (Saxena und Harinder 2004; Harris 2008). Auch in der europäischen Medizin wurden sie bis in die Neuzeit hinein angewandt, jedoch sind die Inhaltsstoffe erst seit wenigen Jahren Gegenstand der phytochemischen Forschung (Tabelle 3). Die meisten dieser Arbeiten beziehen sich auf Lebermoose, da diese häufig Fetttropfchen in den Zellen lagern (Elaioplasten), die als Speicher möglicher interessanter lipophiler Verbindungen gelten (Zinsmeiser et al. 1991; Scher et al. 2003; Otero et al. 2006; Xie und Lou 2009; Asakawa et al. 2013). Der Name Lebermoose entstammt der Signaturlehre, da die lappigen Thalli der Lebermoose der menschlichen Leber ähneln und helfen sollen.

**Tabelle 3** Die wichtigsten Sekundärmetabolite aus Moosen nach Zinsmeister et al. (Zinsmeister et al. 1991), + = nachgewiesene Substanz.

Substanzklasse	Lebermoos	Laubmoos	Hornmoos
<b>Terpene</b>			
Monoterpene	+	+	
Sesquiterpene	+		+
Diterpene	+	+	+
Triterpene	+	+	
Tetraterpene	+	+	+
<b>Steroide</b>	+	+	+
<b>Prenylquinone</b>	+	+	
<b>Phenole</b>			
Benzoessäurederivate	+	+	
Zimtsäurederivate	+	+	+
Bibenzylderivate	+		
Bis(bibenzyl)derivate	+		
Phenoether	+		
Alkylphenole	+		
Flavonoide	+	+	
Acyflavonoide	+	+	
Isoflavonoide		+	
Biflavonoide		+	
Flavon- und Isoflavondimere		+	
Chalconederivate	+		
Aurone	+	+	
Sphagnorubine		+	
Lignane			+
<b>Alkaloide</b>	+		
<b>Cyanoglycoside</b>		+	
<b>Tetrapyrrole</b>	+	+	+
<b>s-Acrylate</b>	+		
<b>Azulene</b>	+		
<b>Naphtalenderivate</b>	+		
<b>Phenantrenderivate</b>	+		
<b>Cyclophane</b>		+	
<b>Vitamine</b>	+	+	

Der Sekundärmetabolismus der Pflanzen hat im Verlauf der Evolution verschiedene Triebfedern gehabt: Häufig fanden Horizontale Gentransfers zwischen den Reichen des Lebens (Bakterien, Archaea, Pilzen, Pflanzen, Tieren) statt (Emiliani et al. 2009; Yue et al. 2012; Li et al. 2014), welche in den Wirten neue funktionelle Proteine entstehen ließen oder alte Gene stilllegten. Als ebenso wichtig erweist sich die Gen- bzw. Genomduplikation, die ein Set homologer Gene zur Verfügung stellt, von denen einige ihre ursprüngliche Funktionalität beibehalten und die Kopien ohne Einbußen frei mutieren und so neue Aktivitäten entwickeln können (Ober 2005; Rensing et al. 2007; Bainard et al. 2013) oder ohne Mutation durch einfache Expressionsunterschiede zu unterschiedlichen Morphologien führen können (Pires und Dolan 2012).

Mit der Eroberung der Erdoberfläche durch Pflanzen sahen sich diese neuen Herausforderungen gegenüber, die im aquatischen Leben fehlten: Es gab eine starke Belastung durch UV-Strahlung, die früher vom Wasser absorbiert wurde. Wasser ist an Land ein limitierter Faktor, es steht nicht überall



uneingeschränkt zur Verfügung. Die Pflanze kann also vertrocknen oder durch zu hohe Luftfeuchtigkeit keinen Stofftransport mehr gewährleisten. Die Erdanziehung wird im Wasser durch den Auftrieb kompensiert. Dieser Auftrieb fehlt in der Luft, so dass stabilisierende Strukturen nötig wurden. Die sauerstoffhaltige Atmosphäre führt zur großen Gefahr des oxidativen Stresses durch Sauerstoffradikale während der primären Stoffwechselvorgänge. Während Wasser auch ein hervorragender Temperaturpuffer ist, zeigt die Luft starke Schwankungen der Temperatur (Waters 2003), und es gab an Land neue Infektionsquellen, da Bakterien das Land schon viel früher besiedeln konnten (Ponce de León und Montesano 2013). Später kam im Zuge der weiteren Landbesiedlung der im Wasser angefangene Konkurrenzkampf um Licht, Nährstoffe und Sexualpartner sowie die Gefahr von Fressfeinden hinzu. All diese Faktoren führten zur Entwicklung eines „evolutiven Wettrüstens“ von Abwehrmechanismen, die den Pflanzen eine höhere Fitness verliehen haben. Eine wichtige Stütze in diesem Überlebenskampf ist der Sekundärstoffwechsel, der die Fitness der Pflanze gegenüber Konkurrenten erhöht (Mello und Silva-Filho 2002).

#### **D. Polyphenolstoffwechsel von *Anthoceros agrestis* und *Physcomitrella patens***

Der Polyphenolmetabolismus zählt neben dem Terpenoidweg zu den ursprünglichsten und am weitesten verbreiteten sekundären Stoffwechselwegen der Pflanze (Emiliani et al. 2009). Phenolische Verbindungen entstehen aus den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, die ihrerseits im Shikimatweg aus Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat über das Zwischenprodukt Shikimisäure in den Pflanzen gebildet werden (Herrmann 1995; Tohge et al. 2013). Polyphenole besitzen mehrere Eigenschaften, die den Pflanzen das Leben an Land erleichtern: Sie können UV-Strahlung absorbieren und Sauerstoffradikale abfangen und so den Photosynthese- und Primärstoffwechselapparat schützen. Mit einem großen delokalisierten Elektronensystem können sie als Farbstoffe Bestäuber und Verbreiter anlocken, sie schützen vor Herbivoren und Infektionen, indem sie Proteine aggregieren, oder sie dienen der Interaktion und Kommunikation. Als Lignin sind sie an der Holzbildung beteiligt und gelten somit neben Cellulose als eines der am häufigsten vorkommenden Biopolymere. Ebenso vielfältig sind die Strukturen der Polyphenole. Unter diesen Begriff fallen alle Substanzen, die zwei oder mehr Hydroxygruppen und Hydroxylderivate an einem Benzolring besitzen. Somit zählen das Lignin und die Lignane, Anthocyane, Flavonoide, Isoflavone, Cumarine, Catechine und Phenylpropanoide dazu. Phenylpropanoide zeichnen sich durch die C6-C3 Struktur aus, also einen aromatischen Ring mit einer C3-Seitenkette (Ferrer et al. 2008; Vogt 2010). In Abbildung 13 sind die ersten Schritte des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels dargestellt.

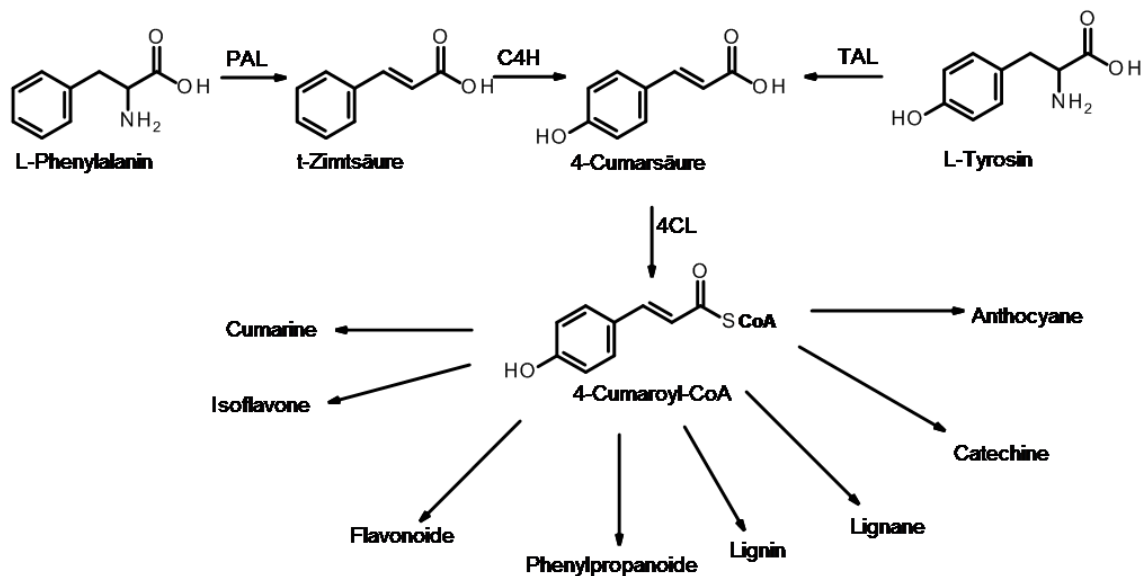
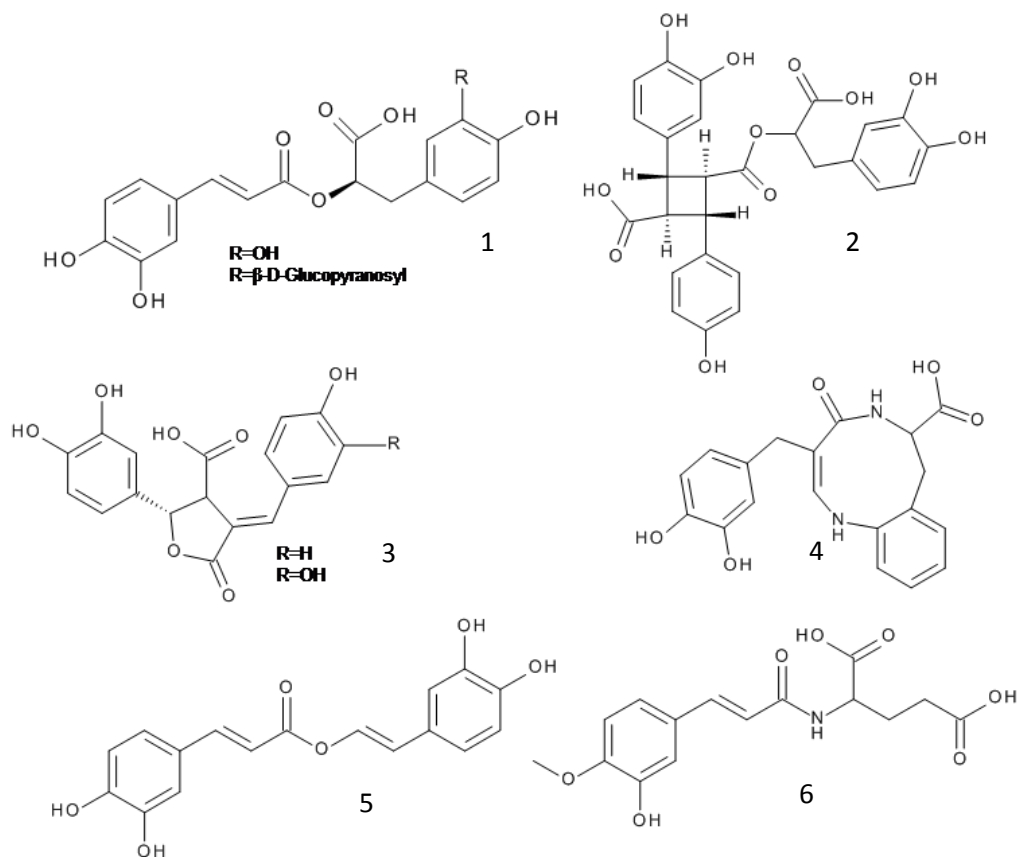


Abbildung 13 Erste enzymatische Reaktionen des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels. PAL = Phenylalanin Ammoniak-Lyase, C4H = Cinnamat 4-Hydroxylase, TAL = Tyrosin Ammoniak-Lyase, 4CL = 4-Cumarat:Coenzym A Ligase.

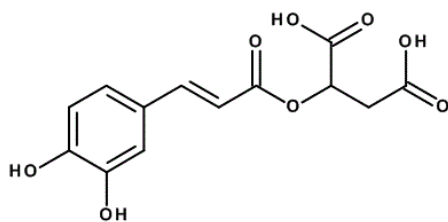
Kaffeesäure (engl. caffeic acid, CA) ist die 3,4-Dihydroxymethylsäure und somit ein mögliches polyphenolischer Metabolit, welches aus Phenylalanin gebildet werden kann. Sie ist ein ubiquitärer Sekundärmetabolit der Pflanzen und wird entweder direkt oder mittelbar in weiteren Verbindungen akkumuliert. Dabei dienen diese Verbindungen entweder durch ihre gerbenden Eigenschaften als Fraß- und Infektionsschutz, oder die Pflanze macht sich die strukturelle Stabilität der Kaffeesäureverbindungen für die Lignifizierung zunutze (Xu et al. 2009). Hydroxymethylsäureester und besonders die Kaffeesäureester sind eine häufig gefundene Derivate dieser organischen Säuren in Pflanzen.

In Hornmoosen sind bereits viele Zimtsäurederivate bekannt. Maßgeblich sind hier die Arbeiten von Takeda sowie von Trennheuser, der in seiner Dissertation eine phytochemische Charakterisierung von *Anthoceros agrestis* und *Phaeoceros laevis* in Zellkulturen gemacht hat (Trennheuser 1992). Zu den hierbei gefundenen Strukturen zählen Rosmarinsäure (Takeda et al. 1990) und Rosmarinsäure-3'-O-β-D-Glucosid (RA-Glc) (Vogelsang et al. 2006), Anthocerossäure und (Hydroxy-)Megacerossäure (Takeda et al. 1990), Anthocerodiazonin (Trennheuser et al. 1994), Caffeoyl-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethenylester und N-isoferuloyl-Glutaminsäureamid (Trennheuser 1992) (Abb. 14). Enzyme des Polyphenolmetabolismus, die aus *Anthoceros spec.* oder *Physcomitrella patens* isoliert und/oder charakterisiert wurden sind die C4H (Petersen 2003) und eine Peroxidase (Chasov et al. 2012) aus *Anthoceros* sowie die 4CL und eine Chalkonsynthase aus *Physcomitrella* (Jiang et al. 2006; Silber et al. 2008).



**Abbildung 14** Auswahl von Kaffeesäurederivaten aus *Anthoceros agrestis*. 1 = Rosmarinsäure, Rosmarinsäure-Glycosid, 2 = Anthocerossäure, 3 = Megacerossäure, Hydroxymegacerossäure, 4 = Anthocero-diazonin, 5 = Caffeoyl-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylester, 6 = *N*-isoferuloyl-Glutaminsäureamid.

Regulationsmechanismen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus im Allgemeinen und des phenolischen Stoffwechsels im Speziellen sind teilweise erforscht. Bekannt ist, dass die Enzyme häufig licht- und verletzungsinduziert sind, was die Bedeutung der Flavonoide oder des Lignins besonders unterstreicht (Dixon und Paiva 1995). Besondere Erwähnung sollten hier die Phaselinsäure und ihre Derivate finden (Abb. 15), die Otero und Arroniz-Crespo in ihren Studien mit Lebermoosen untersucht haben (Otero et al. 2006; Arróniz-Crespo et al. 2008). Phaselinsäure ist das Caffeoylmalat und wurde mit dem 4-Cumaroyl- und dem Feruloyl-Analogen bei induziertem Stress (UV und Schwermetalle) vermehrt akkumuliert. Es ist durchaus vorstellbar, dass auch Hornmoose und Laubmoose ähnliche Reaktionen auf Stress zeigen. Anne Döring konnte dies für die Rosmarinsäure in höheren Pflanzen (Zitronenmelisse) bei Ozonbelastung zeigen (Döring et al. 2014). Die Regulation findet auf Translations- oder Transkriptionsebene statt, auch eine Feedback-Regulation ist bekannt (Herrmann 1995).



**Abbildung 15** Phaselinsäure.

## 1. Rosmarinsäurebiosynthese

Rosmarinsäure ist der Ester der 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure mit der Kaffeesäure. Rosmarinsäure wurde 1958 in Rosmarin entdeckt (Scarpati und Oriente 1958). Sie zählt zu den Labiatengerbstoffen, da sie häufig in Lamiaceae gefunden wird, beschränkt sich aber nicht auf diese Familie. Inzwischen sind knapp 40 Pflanzenfamilien bekannt, in denen Rosmarinsäure gefunden wurde (Petersen 2013). Diese Familien umfassen neben den Zweikeimblättrigen auch Einkeimblättrige Samenpflanzen, Farne und Hornmoose (Harborne 1966; Takeda et al. 1990; Petersen und Simmonds 2003; Petersen 2013). Unklar ist, ob die Fähigkeit, Rosmarinsäure zu synthetisieren, bei der Trennung der Tracheophyten und der Anthocerotophyten vorhanden war und dann bei vielen Taxa verloren ging (was der sparsamsten Entwicklung entspricht) oder ob die Fähigkeit sich in den einzelnen Taxa unabhängig entwickelt hat. Diese Annahme könnte bedeuten, dass die Rosmarinsäurebiosynthese sowohl hinsichtlich der Enzyme als auch der Substrate zwischen Anthocerotaceae und Lamiaceae einen unterschiedlich sind. Mittlerweile sind auch verschiedene Derivate der Rosmarinsäure bekannt, diese treten häufig in *Anthoceros agrestis* Kulturen auf. Die Erforschung der Rosmarinsäurebiosynthese begann schon 1970 mit dem ersten Vorschlag eines Stoffwechselwegs durch Ellis und Towers (Ellis und Towers 1970), wurde aber erst 1993 von Petersen et al. vollständig für die Lamiacee *Coleus blumei* beschrieben (Abb. 16) (Petersen et al. 1993): Aus den beiden Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin wird mit Hilfe von fünf löslichen und drei ER-membranverankerten Enzymen im Cytosol Rosmarinsäure gebildet, welche dann in der Vakuole akkumuliert wird. Dabei wird Phenylalanin zu t-Zimtsäure desaminiert (Razzaque und Ellis 1977), in Stellung 4 hydroxyliert (Vetter 1988) und CoA-aktiviert (Karwatzki et al. 1989). Gleichzeitig wird das Tyrosin transaminiert (De-Eknamkul und Ellis 1987) und reduziert (Petersen und Alfermann 1988; Häusler et al. 1991; Petersen et al. 1993; Xiao et al. 2011). Beide Intermediate werden verestert (Petersen und Alfermann 1988) und hydroxyliert (Petersen 1997). Ob dieser Weg in *Anthoceros agrestis* genauso verläuft ist weitestgehend unbekannt.

Die Effekte der Rosmarinsäure und ähnlicher Kaffeesäurederivate sind schon lange vor der Entdeckung der Gerbstoffe geschätzt gewesen, so dass Melisse (*Melissa officinalis*), Salbei (*Salvia officinalis*), Lavendel (*Lavandula angustifolia*), Oregano (*Origanum vulgare*), Thymian (*Thymus vulgaris*) oder Minzen (*Mentha spec.*) nicht nur aufgrund ihrer ätherischen Öle als Gewürz verwendet wurden, sondern auch aufgrund ihrer konservierenden, antimikrobiellen Wirkung. Die Wirkung der Rosmarinsäure in Tieren soll vielfältig sein: antiviral, antibakteriell, antifungisch, antidepressiv, anticancerogen, antiinflammatorisch, antioxidativ, neuroprotektiv, cardioprotektiv, hepatoprotektiv, und viele weitere (Nakazawa und Ohsawa 1998; Baba et al. 2004; Dubois et al. 2008; Furtado et al. 2008; Awad et al. 2009; Obulesu und Rao 2011). Viele dieser Effekte wurden mit isolierter Rosmarinsäure in *in vitro* Kulturen untersucht, so dass eine Übertragung auf den Menschen mit seinen komplexen Lebensgewohnheiten schwierig ist.

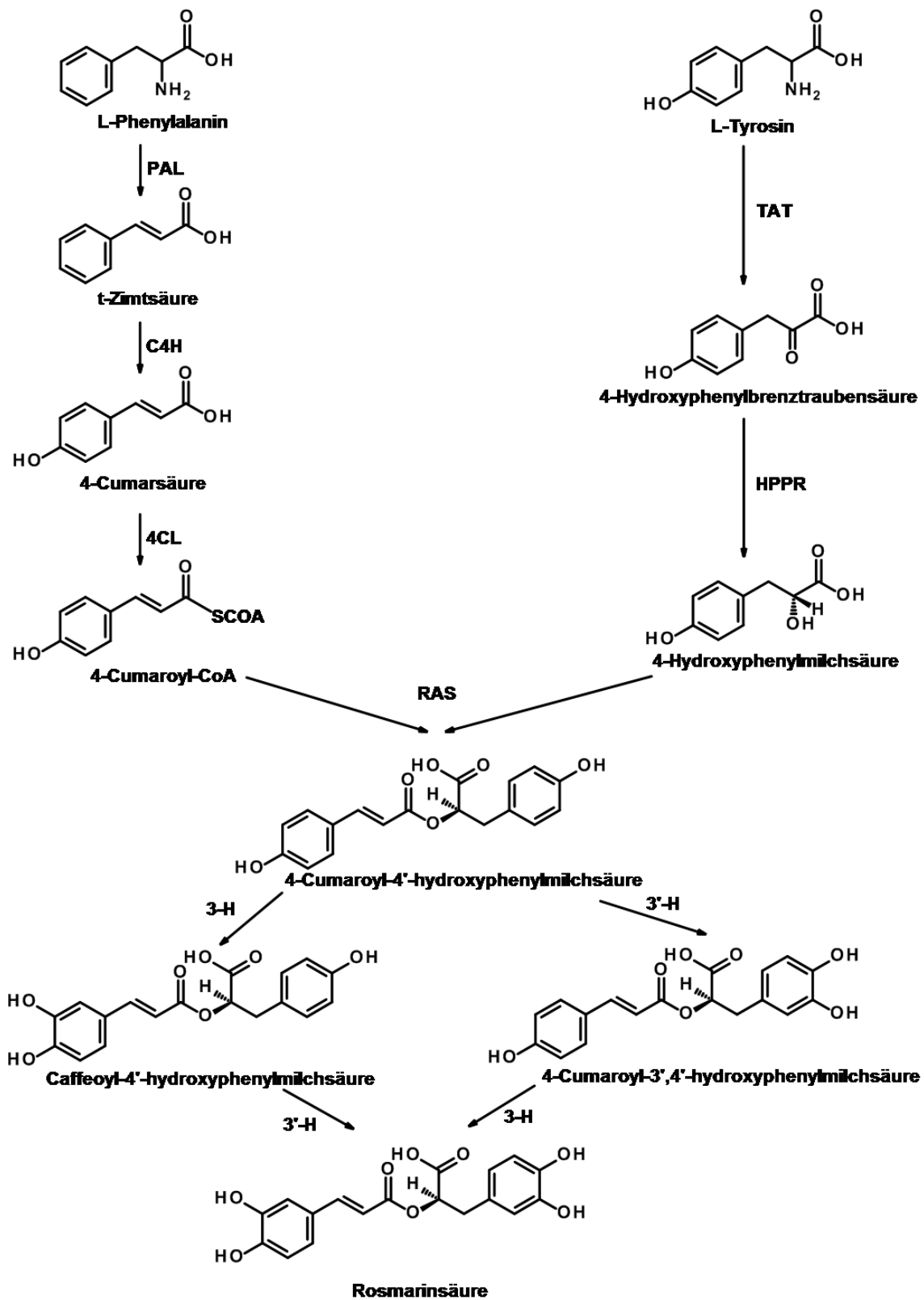


Abbildung 16 Biosynthese von Rosmarinsäure in Lamiaceae, nach Petersen et al. (1993). PAL = Phenylalanin Ammoniak-Lyase, C4H = Cinnamat 4-Hydroxylase, 4CL = 4-Cumarat:Coenzym A Ligase, TAT = Tyrosin Aminotransferase, HPPR = Hydroxyphenylpyruvat Reduktase, RAS = Rosmarinsäure Synthase (Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase), 3-H/3'-H = 3-/3'-Hydroxylase.

### a) Phenylalanin Ammoniak-Lyase

Der Biosyntheseweg der Polyphenole startet mit der Aminosäure L-Phenylalanin. Mit Hilfe der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL, EC 4.3.1.24) bildet sich die *trans*-Zimtsäure. 1961 wurden sie erstmals beschrieben (Koukol und Conn 1961). Diese Reaktion findet im Cytosol statt. Die PAL ist das Schlüsselenzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels und eines der am besten untersuchten Sekundärmetabolismusenzymer der Pflanzen. Sie gehört zusammen mit der Tyrosin Ammoniak-Lyase (TAL) und der Histidin Ammoniak-Lyase (HAL) zu den aromatischen Aminosäurelyasen. Während PAL und TAL weitestgehend auf Pflanzen beschränkte Enzyme sind (Ausnahmen bilden einige Pilze und Prokaryonten (Kalghatgi und Subba Rao 1975; Fritz et al. 1976; Moffitt et al. 2007; Hyun et al. 2011)), kommt HAL auch in Tieren, Pilzen und Bakterien vor. Phylogenetische und strukturelle Studien weisen auf eine Verwandtschaft dieser Enzyme miteinander sowie einer Entwicklung der PAL und TAL aus der HAL (Ritter und Schulz 2004) oder aber eine weitestgehend unabhängige Entwicklung der HALs und der PALs hin (Emiliani et al. 2009). Aus einkeimblättrigen Pflanzen sind PALs bekannt, die auch TAL-Aktivität aufweisen (Rösler et al. 1997). PALs sind große Enzyme, die als Homotetramere vorliegen. Die cDNA einer (der vier) *Arabidopsis thaliana* PAL codiert 717 Aminosäuren, die ein Protein mit einem Molekulargewicht von 78 kDa ergeben (Cochrane et al. 2004). Sie besitzen eine katalytische Triade aus den drei benachbarten Aminosäuren Alanin-Serin-Glycin am N-terminalen Ende, welche in einer autokatalytischen Cyclisierungsreaktion die sogenannte MIO-Gruppe bilden, das 3,5-Dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-on (Abb. 17). Die MIO-Gruppe bringt das benötigte elektrophile Potential für die Desaminierung des Phenylalanins zu *trans*-Zimtsäure und einem Ammoniumion auf. Der Mechanismus ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion, vieles weist jedoch darauf hin, dass es sich nicht um eine elektrophile Addition handelt, wie lange Zeit angenommen wurde, sondern um eine Friedel-Crafts-Reaktion (Calabrese et al. 2004; Bartsch und Bornscheuer 2009) (Abb. 18). Die PAL-Expression in der Pflanze ist schon lange Gegenstand der Forschung. Bekannt ist etwa die Aktivierung der Gene durch UV-Licht und Elicitorer (Lois et al. 1989).

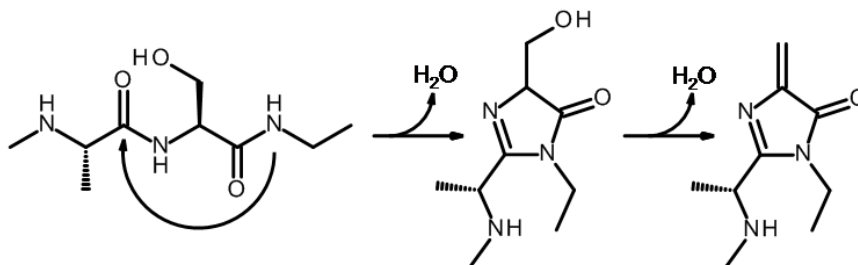
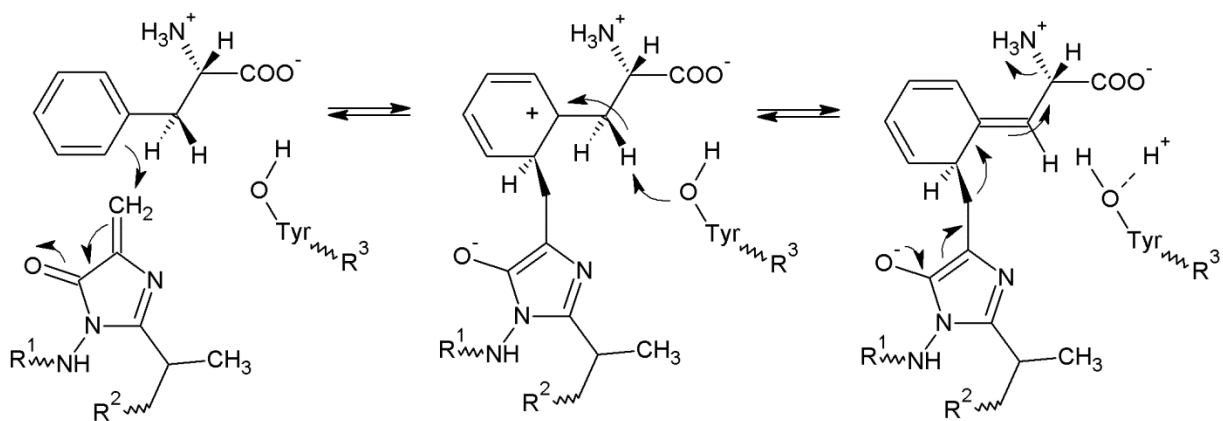


Abbildung 17 Die Autocyclisierung der drei Aminosäuren Alanin-Serin-Glycin führt in der PAL unter Wasserabspaltung zur Bildung der MIO-Gruppe (Ritter und Schulz 2004).



**Abbildung 18** Möglicher Katalysemechanismus der PAL nach Ritter und Schulz (2004). R1, R2 und R3 gehören zur PAL. Unter Verlust der Aromatizität entsteht eine Bindung zwischen der MIO-Gruppe und dem Phenylalanin. Eine Deprotonierung am  $\beta$ -C-Atom des Phenylalanins bewirkt unter gleichzeitiger Wiederherstellung des aromatischen Rings ein Umklappen der Elektronen, die zum Abgang des Ammoniaks führt.

In vielen Pflanzen wurden zwischen 3 und 5 Genkopien der PAL nachgewiesen (Hyun et al. 2011), ohne jedoch für jedes Enzym Aktivität und Expressionsverhalten nachzuweisen. Die meisten PAL (40-50) wurden bisher in der Kartoffel nachgewiesen (Joos und Hahlbrock 1992).

### b) Cinnamat 4-Hydroxylase

Die Cinnamat 4-Hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11) ist eine Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase (CYP73). Sie gehört damit einer sehr großen Enzymklasse an, die eine Vielzahl von Reaktionen in fast allen Pro- und Eukaryonten katalysiert und nur phylogenetisch und nicht katalytisch definiert ist. Die katalytische Funktion der C4H liegt in der Einführung einer Hydroxygruppe an Position 4 der *t*-Zimtsäure. Es entsteht 4-Cumarsäure. 1965 wurde sie erstmals in Spinat beschrieben (Nair und Vining 1965). CYPs sind Häm-Proteine, das Fe(III) ist an einem konservierten Cystein gebunden. Weitere konservierte Bereiche sind für die Stabilisierung und für den Schutz der katalytischen Tasche erforderlich. Das Vorhandensein dieser konservierten Aminosäuren bestimmt die enzymologische Einteilung der CYPs. Generell werden verschiedene Reaktionen katalysiert, etwa im Fettsäure- und Steroidstoffwechsel, dem Abbau von Xenobiotica, dem Hormon- und Sekundärmetabolismus (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). Das Substrat und molekularer Sauerstoff binden an das Eisen der Häm-Gruppe, welches über eine Spin-Aktivierung zu zweiwertigem Eisen reduziert wird. In diesem Zustand wird eines der Sauerstoffatome im  $O_2$  hydriert und spaltet sich als Wasser ab, während das zweite Sauerstoffatom am Substrat bindet und eine OH-Gruppe bildet. Die Reaktion ist  $NADPH+H^+$ -abhängig und braucht ein weiteres ER-gebundenes Enzym, die FAD- und FMN-abhängige CYP450-Reduktase, um die Monooxygenase zu reaktivieren. Der Name Cytochrom P450 leitet sich vom Absorptionsmaximum des Enzyms bei Inhibierung durch Kohlenstoffmonooxid bei 450 nm ab. Bei dieser Wellenlänge findet auch eine Reaktivierung des Enzyms statt (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000).

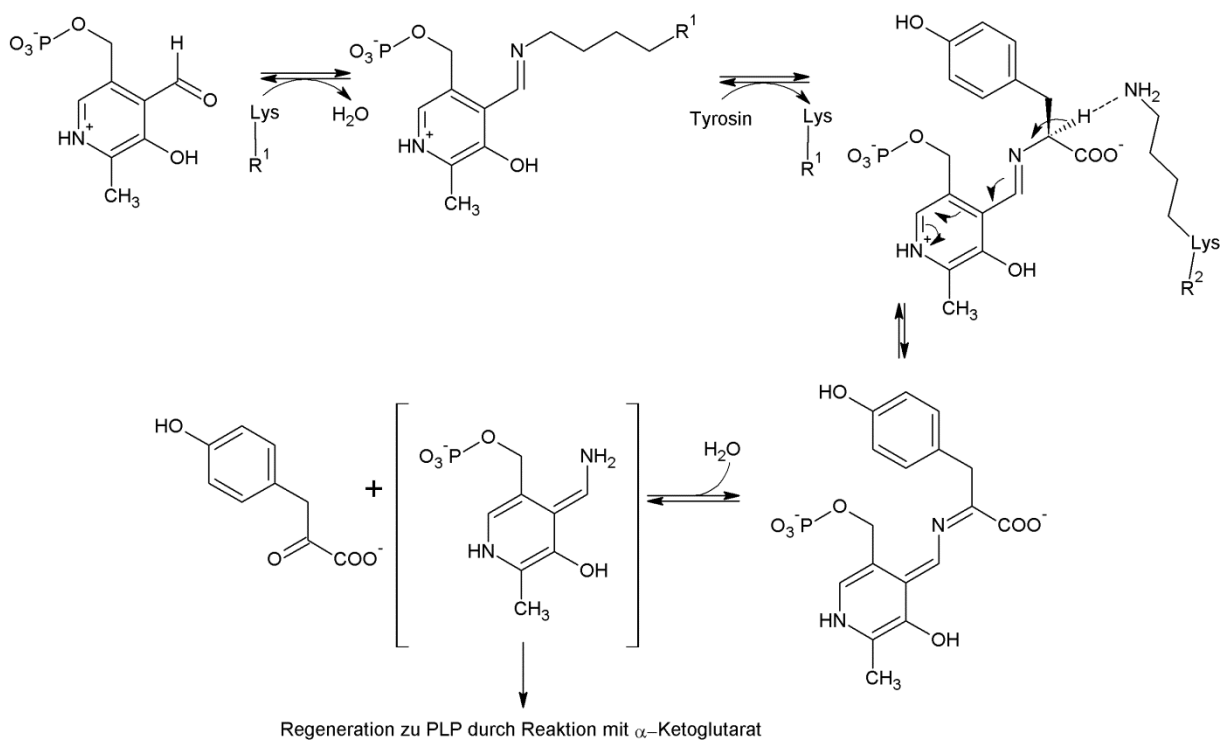
### c) 4-Cumarat:Coenzym A Ligase

Das dritte Enzym des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels, das die Aktivierung der 4-Cumarsäure über einen Thioester vermittelt, ist die 4-Cumarat:Coenzym A Ligase (4CL, EC 6.2.1.12). Es handelt sich wieder um ein lösliches Protein im Cytosol von Pflanzen; Enzyme mit ähnlicher Aktivität und hoher Sequenzidentität wurden aber auch in *Streptomyces* gefunden. Die 4CL-Reaktion

ist ATP-abhängig. Unter Hydrolyse von Pyrophosphat von AMP wird das Substrat 4-Cumarsäure adenyliert. Der nucleophile Angriff von Coenzym A auf das Zwischenprodukt führt zur Bildung von 4-Cumaroyl-CoA und AMP wird freigesetzt. Eine spezifisches Adenosinbindungsmotif zeichnet die Sequenz der 4CLs aus. Eine evolutionäre Abstammung von der Acetyl:CoA Ligase, Fettsäuresynthasen und Peptidasen des Primärstoffwechsels ist evident (Schneider et al. 2003). Neben 4-Cumarsäure werden andere Zimtsäurederivate akzeptiert.

#### d) Tyrosin Aminotransferase

Die Tyrosin Aminotransferase (TAT, EC 2.6.1.5) ist ein Enzym, das den Primär- mit dem Sekundärstoffwechsel verbindet. Es katalysiert die Transaminierung von Tyrosin zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) unter gleichzeitiger Reaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat. Die Reaktion ist Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängig. Das Produkt pHPP wird hauptsächlich über das Zwischenprodukt Homogentisinsäure für die Tocopherol- und Plastochinon-Biosynthese verwendet (Fiedler et al. 1982). Über das Intermediat 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL) geht es jedoch in die Rosmarinsäurebiosynthese ein. PLP ist in den Aminotransferasen kovalent über eine Iminverbindung mit einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines konservierten Lysins gebunden. Der Reaktionsmechanismus ist ein „Ping-Pong-Mechanismus“ des Cofactors zwischen den Substraten. Dabei wird zuerst die Aminosäure zur korrespondierenden  $\alpha$ -Ketosäure desaminiert, anschließend die andere Ketosäure zur Aminosäure transformiert (Prabhu und Hudson 2010) (Abb. 19). Dadurch ist eine ausgesprochene Reversibilität der Reaktion gegeben.



**Abbildung 19** Möglicher Katalysemechanismus der TAT. R1 und R2 gehören zur TAT. Abgebildet ist die erste Teilreaktion, bei der das PLP mit einem konservierten Lysin eine Schiff'sche Base bildet. Die Aminogruppe des Tyrosins löst das Lysin ab und unter Hydrolyse wird pHPP freigesetzt.

Bis hier sind alle genannten Enzymreaktionen nicht spezifisch für die Rosmarinsäurebiosynthese. Durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Edukten und Korrelationen der Enzymaktivitäten mit Intermediaten und der Rosmarinsäure Akkumulation wurde deren Beteiligung an diesen Stoffwechselwegen aufgeklärt (Ellis und Towers 1970).



### e) Hydroxyphenylpyruvatreduktase

Die Hydroxyphenylpyruvatreduktase (HPPR, EC 1.1.1.237) katalysiert die  $\text{NADH} + \text{H}^+$ -abhängige Reduktion von *p*-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) zu *p*-Hydroxyphenyllactat (pHPL). Sie ist verwandt mit der D-Lactat Dehydrogenase, der D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase und der Hydroxypyruvatreduktase (HPR). Diese Enzyme werden zu der Familie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen gerechnet (Grant 1989). Die HPR liegt in Pflanzen in drei Isoformen vor, die erste Form ist cytosolisch, die zweite ist plastidär, die dritte peroxisomal und ist ein Enzym der Photorespiration (Timm et al. 2008). Die HPPR, die ebenfalls cytosolisch ist, könnte mit der cytosolischen HPR verwandt sein.

Da bisher in Pflanzen pHPL nur in Zusammenhang mit der Biosynthese von Rosmarinsäure bekannt ist, ist die HPPR das erste spezifische Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese (Kim et al. 2004). Als Reduktionsäquivalent werden sowohl NADH als auch NADPH akzeptiert, als Substrate 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) und 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP). Entscheidend ist eine *p*-Hydroxygruppe am aromatischen Ring, da Phenylpyruvat kaum akzeptiert wird (Häusler et al. 1991; Kim et al. 2004).

### f) Rosmarinsäure Synthase

Rosmarinsäure Synthase (RAS, eigentlich: Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase, EC 2.3.1.140) ist ein Vertreter der Hydroxycinnamoyltransferasen (HCT) der BAHD-Acyltransferase-Familie. Sie verwendet in ihrer natürlichen Reaktion 4-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenylmilchsäure und bildet 4-Cumaroyl-pHPL (Petersen und Alfermann 1988; Petersen et al. 1993). Reaktionen von Caffeoyl-CoA als Donor mit pHPL oder 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure (DHPL) als Akzeptor wurden beschrieben (Petersen und Alfermann 1988; Petersen et al. 1993; Petersen und Metzger 1993; Berger et al. 2006; Sander und Petersen 2011). Bisher sind die Gensequenzen von RAS aus fünf Lamiaceen bekannt: *Solenostemon scutellarioides* (AM283092), *Melissa officinalis* (FR670523), *Lavandula angustifolia* (JF343521), *Glechoma hederacea* (HG423396, HG423397) und *Salvia miltiorrhiza* (FJ906696 bzw. GU647199) (Petersen 2013). Dadurch sind die katalytisch spezifischen Aminosäuren, die eine Präferenz zu dem einen oder anderen Akzeptor der HCTs bewirken noch nicht vollständig bekannt.

### g) 3- und 3'-Hydroxylasen

Die 3- und 3'-Hydroxylasen schließen die Biosynthese der Rosmarinsäure ab, indem sie das 4-Cumaroyl-pHPL an Position 3 und 3' hydroxylisieren. Es handelt sich um zwei Cytochrom P450 abhängige Monooxygenaseaktivitäten, wie sie auch die C<sub>4</sub>H ist, sie sind jedoch spezifisch für Rosmarinsäure-ähnliche Substrate, so dass 4-Cumarsäure oder 4-Cumaroyl-CoA nicht reagieren.

Rosmarinsäure wird im Anschluss an die Biosynthese aus dem Cytosol in die Vakuole transportiert und dort akkumuliert (Häusler et al. 1993). In Hornmoosen wurden Derivate der Rosmarinsäure entdeckt, etwa die Anthocerossäure, die ein [2+2]-Cycloadditionsprodukt der Rosmarinsäure mit 4-Cumarsäure ist oder die Hydroxymegacerossäure und Megacerossäure, die das Lacton der Rosmarinsäure bzw. Caffeoyl-pHPL darstellen, sowie das Rosmarinsäureglycosid. Andere Derivate der Rosmarinsäure sind z.B. die Lithospermsäure B aus *Salvia miltiorrhiza*, die das Epoxid aus zwei Rosmarinsäuremolekülen darstellt (Xiao et al. 2011).

## E. BAHD Acyltransferasen

Die BAHD Acyltransferasen sind eine Superfamilie pflanzlicher Sekundärmetabolismusenzymer. Sie übertragen Säurereste auf Akzeptoren, sind also für viele Ester- und Amidverbindungen verantwortlich. Benannt ist diese Enzymgruppe als Akronym aus den ersten Buchstaben der ersten vier charakterisierten Enzyme dieser Gruppe: Benzylalkohol *O*-Acetyltransferase (BEAT), Anthocyan *O*-Hydroxycinnamoyltransferase (AHCT), Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase (HCBT) und Deacetylindolin 4-*O*-Acetyltransferase (DAT). Es sind monomere, lösliche und cytosolische Enzyme mit einem Gewicht zwischen 48 und 55 kDa und um die 445 Aminosäureresten. Phylogenetische Analysen zeigen, dass die Enzyme dieser Familie sehr heterogen sind, generell ist die Ähnlichkeit der Gen- und der Proteinsequenzen untereinander gering. Sie zeichnen sich jedoch durch zwei hochkonservierte Bereiche aus: Einem in N-terminaler Nähe befindlichen HXXXDG Motiv, und einem C-terminal befindlichen DFGWG Motiv. Dabei wurden allerdings auch mögliche Varianten dieser Motive beschrieben, etwa der Austausch des Glycins im HXXXDG durch andere kleine Aminosäuren wie Alanin oder Serin oder der Austausch des Tryptophans im DFGWG Motiv durch ein Tyrosin (St. Pierre et al. 1998; St. Pierre und de Luca 2000; D'Auria 2006). Die Katalyse erfolgt hier durch das Histidin im ersten Motiv: Ein Proton eines Amins oder Alkohols des Akzeptormoleküls wird durch Histidin abstrahiert. Das nun negativ geladene Heteroatom (Stickstoff oder Sauerstoff) greift die Thioesterbindung des Acyldonors an. Unter Freigabe des Amids bzw. des Esters und des freien Coenzyms A wird die Reaktion beendet (Ma et al. 2005). Hingegen ist das DFGWG-Motiv kein katalytisches Motiv, sondern ein strukturgebendes Motiv (Ma et al. 2005; Unno et al. 2007). Durch die geringe Sequenzähnlichkeit der Mitglieder der BAHD-Superfamilie und ihrer einzelnen Enzymgruppen untereinander lassen sich wenig Vorhersagen über natürliche Substrate der Enzyme treffen (Luo et al. 2007). Die BAHD-Superfamilie wird in fünf Kladen aufgeteilt, diese Sortierung ist phylogenetisch begründet und gibt die katalytische Aktivität nur grob wieder: Klade 1 enthält Enzyme, die eine Veränderung phenolischer Glycoside bewirken, etwa die Übertragung von Malonyl-Einheiten auf Anthocyanglycoside. Klade 2 besteht aus wenigen bekannten Enzymen, die im Rahmen der extrazellulären Wachsbildung aktiv sind. In der dritten Klade finden sich überwiegend Acetyl-CoA (und mittelkettige CoA-aktivierte Säuren) abhängige Enzyme, die das Substrat auf Alkoholreste übertragen und damit für viele flüchtige Aromen in Blüten und reifen Früchten verantwortlich sind. Die vierte Klade enthält wieder nur wenige bekannte Enzyme, die eine Amidbildung katalysieren. In die fünfte Klade fallen eine Reihe von Enzymen mit verschiedenen Produktbildungsreaktionen, etwa die Bildung flüchtiger Verbindungen (außer Acetyl- auch z.B. Benzoyl-Ester) oder die Übertragung von Hydroxyzimtsäuren. Tuominen et al. schlagen vor, diese fünf Kladen auf acht zu erweitern. In einer speziesübergreifenden phylogenetischen Studie konnten sie die Notwendigkeit von Untergruppen der einzelnen Kladen nachweisen (Tuominen et al. 2011). Ferner schlagen sie kladenspezifische Sequenzmotive zusätzlich zu den oben erwähnten allgemeinen Motiven vor.

Die Ursprünge der BAHD-Acyltransferasen werden in den bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferasen vermutet (Murray und Shaw 1997). Die Reaktionsprodukte, die durch BAHD-Acyltransferasen gebildet werden, sind sehr vielfältig, und die neu identifizierten Enzyme in dieser Familie nehmen schnell zu. Dies ist ein Hinweis auf die hohe Evolutionsrate, die diese Enzyme aufweisen (Luo et al. 2007). Spezifische Strukturelemente sind die zwei Domänen der BAHD-Acyltransferasen, die Domänen I und II, die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Die Enzyme, die eine Acylierungsreaktion eines Donors auf einen Akzeptor katalysieren, besitzen eine tunnelartige Struktur mit zwei Eingängen für die beiden Substrate. Ein induced fit bewirkt eine

passgenaue Orientierung und Fixierung der Substrate im Enzym (Lallemand et al. 2012; Walker et al. 2013).

### **1. Hydroxycinnamoyltransferasen**

Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs) sind eine Unterform der BAHD-Acyltransferasen der fünften Klade, sie übertragen eine aktivierte Hydroxyzimtsäure auf ein Akzeptor-Hydroxid oder -Amin. Die katalysierten Reaktionen sind reversibel. Die Substratpräferenz ist mitunter sehr breit, so dass als Acyldonor nicht nur 4-Cumaroyl-CoA, die einfachste Hydroxyzimtsäure, in Frage kommt, sondern auch Cinnamoyl-, Caffeoyl-, Feruloyl- oder Sinapoyl-CoA, wobei die Präferenz mit zunehmender Hydrophobizität abnimmt (Walker et al. 2013). Auch bei dem Akzeptor kann es zu einer Substratpromiskuität kommen, besonders bei Chinasäure und Shikimisäure wurden Enzyme beschrieben, die beide Substrate akzeptieren, wenn auch mit unterschiedlicher Präferenz (Hoffmann et al. 2003; Landmann et al. 2011; Lallemand et al. 2012) oder nur einen von beiden Akzeptoren annehmen (Comino et al. 2009; Sander und Petersen 2011). Bei der Präferenz des Substrats muss bedacht werden, dass etwa bei der Übertragung auf ein Molekül Shikimisäure durch die SP<sup>2</sup>-Hybridisierung im Ring eine andere Struktur vorliegt als in der Chinasäure, die nicht nur vollständig gesättigte C-C-Bindungen aufweist, sondern dadurch auch noch zwei funktionelle Gruppen die aus der Ebene heraus stehen. 4-Hydroxyphenyllactat wiederum besitzt einen aromatischen Ring, der starr und planar ist (Walker et al. 2013). Eine jede HCT muss auf diese Aspekte durch Änderung der Tertiärstruktur (induced fit) und durch den Einsatz von passenden Aminosäureresten im katalytischen Zentrum reagieren können.

Den HCTs wird eine wichtige Rolle in der Lignifizierung von Pflanzen zugeschrieben. Durch Regulation der HCT-Expression konnte in *Arabidopsis thaliana* eine Veränderung der Monomereinheiten im Lignin bewirkt werden, welche sich aber auch in reduziertem Wachstum äußerte (Hoffmann et al. 2004; Li et al. 2010). Nichtsdestotrotz könnte eine Regulation oder Modifikation der HCTs in Nutzpflanzen ein interessanter Angriffspunkt in der biotechnologischen Holzverwertung sein, da Lignin zurzeit ein störendes Element sowohl in der Papier- als auch in der Bioethanol-Herstellung darstellt und Holz außer für die Verfeuerung nur nach aufwendiger chemischer Hydrolyse verarbeitet werden kann.

#### **a) Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase**

Eine Vielzahl pflanzlicher Phenole basiert auf hydroxylierten oder methoxylierten Verbindungen, allen voran das Lignin, das neben Cumaroylalkohol aus Coniferyl- und Sinapylalkohol besteht. Die Prozessierung von 4-Cumaroyl-CoA zu diesen Substanzen erfolgt häufig über den Shikimisäureester. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, ist die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST, EC 2.3.1.133). Das gebildete 4-Cumaroyl-Shikimat wird am Cumarsäurerest zu Caffeoyl-5'-*O*-Shikimat (Abb. 20) hydroxyliert und eventuell weiterverarbeitet (weitere Hydroxylierungen oder Methyltransferasereaktionen). Anschließend wird die Esterbindung durch die HST wieder in eine Thioesterbindung mit Coenzym A überführt oder vollständig durch eine Caffeoyl Shikimat Esterase (CSE) gespalten (Vanholme 2013). Das freiwerdende Zimtsäurederivat wird nun in die entsprechenden Biosynthesewege abgeführt (und etwa zu den oben genannten Verbindungen reduziert) (Ferrer et al. 2008). Bisher konnten weder diese Verbindungen (Lignin) noch eine HST-Aktivität in Moosen nachgewiesen werden, obschon komplexe lignanartige Verbindungen in Hornmoosen identifiziert wurden. Durch ihre Bedeutung für die Lignifizierung wird in jeder Gefäßpflanze das Vorhandensein einer HST oder eines HST-artigen Enzyms erwartet.

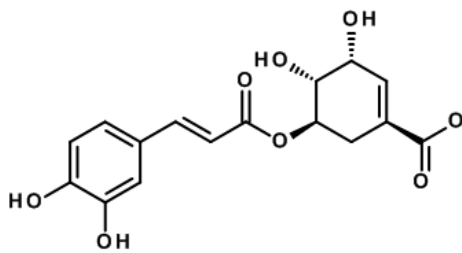


Abbildung 20 Caffeoyl-Shikimat.

2013 präsentierten Walker et al. eine kristallographische Röntgenstrukturaufklärung der Struktur und des Reaktionsmechanismus einer HST aus der Mohrenhirse *Sorghum bicolor* für die Reaktion von 4-Cumaroyl-CoA mit Shikimisäure (Walker et al. 2013). Der aufgeklärte Reaktionsmechanismus ist vereinfacht in Abbildung 21 dargestellt. Entscheidend ist hier das Histidin des HXXXDG-Motivs, welches das alkoholische Proton des Shikimats abstrahiert und somit den nucleophilen Angriff des Sauerstoffs auf die Thioesterbindung ermöglicht. Nach der Umesterung entstehen freies Coenzym A und Caffeoyl-Shikimat.

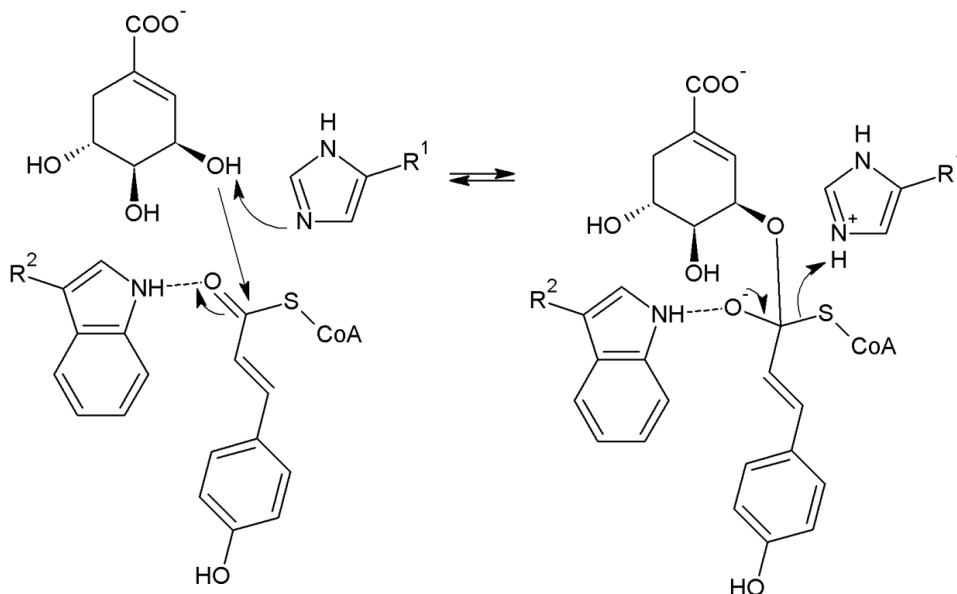


Abbildung 21 Vereinfachter Katalysemechanismus der HST nach Walker et al. (2013). R1 und R2 gehören zur HST. Das konservierte Histidin der HST abstrahiert das Proton der Shikimisäure, so dass ein nucleophiler Angriff auf den Kohlenstoff in der Thioesterbindung des 4-Cumaroyl-CoA stattfinden kann.

Für diese HST wurde bestätigt, was allgemein für die BAHDs angenommen wird: Das Enzym besitzt zwei substratspezifische Öffnungen, durch die die Substrate getrennt eintreten, um im hydrophoben Katalysezentrum zu reagieren. Die Hydrophobizität wird durch thermodynamische Studien belegt, die darauf hinweisen, dass nur wenig Wasser verdrängt wird. Diese Daten weisen weiterhin darauf hin, dass zuerst die Assoziation des 4-Cumaroyl-CoAs im Enzym stattfindet und dann das Shikimat gebunden wird.

### b) Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase

Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen (HQT, EC 2.3.1.99) sind weitere Vertreter der HCTs. Sie sind zuständig für die Biosynthese von Chlorogensäure (Abb. 22) aus 4-Cumaroyl-CoA und Chinasäure mit anschließender Hydroxylierung (Sonnante et al. 2010). Ähnlich wie bei der Rosmarinsäurebiosynthese erfolgt nach der Esterbildung durch die HQT eine

Hydroxylierung der 4-Cumarsäureeinheit zu Kaffeesäure durch eine 3'-Hydroxylase. Chinasäure ist ein Intermediat des Shikimatweges. Die Chlorogensäure ist wie die Rosmarinsäure vielfach in Pflanzen als adstringierender Fraß- und Infektionsschutz oder als Stressantwort zu finden (Niggeweg et al. 2004; Clé et al. 2008), in einigen wenigen Ausnahmen wurden beide Stoffe parallel nachgewiesen. Chlorogensäure ist vermutlich nach der Grünfärbung der Nachweisreaktion in alkalischer Proteinlösung so benannt. Chlorogensäure wird ebenso wie Rosmarinsäure im Cytosol synthetisiert und in der Vakuole gespeichert. Zusätzlich kommt es zu einer Bildung von DicaFFEoylchinat, welches ähnliche physiologische Eigenschaften besitzt (Comino et al. 2009). Angenommen wird eine Übertragung von einem Caffeoylest eines Chlorogensäuremoleküls auf ein zweites Molekül Chlorogensäure (Moglia et al. 2014). Die dafür benötigte Chlorogenat:Chlorogenattransferase-Aktivität wird von einer vakuloischen Form der HQT gestellt.

So wie bei Caffeoylestshikimat kann die Chlorogensäure nach den Modifikationen am phenolischen Rest durch die HQT wieder hydrolysiert werden und die freigewordene Coenzym A-aktivierte Hydroxyzimtsäure als Monomer der Ligninbiosynthese verwendet werden (Comino et al. 2007). 4-Cumaroyl-CoA bildet demnach mit Chinasäure das 4-Cumaroyl-Chinat, welches hydroxyliert und methyliert wird, anschließend erfolgt eine Coenzym A-Veresterung des Hydroxyzimtsäurederivats durch die HQT oder eines HQT-artigen Enzyms (Comino et al. 2009).

Bisher konnten keine Chlorogensäureakkumulation und keine HQT-Aktivität in Moosen nachgewiesen werden.

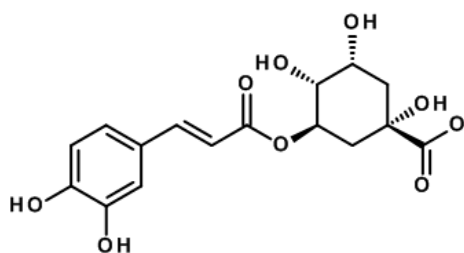


Abbildung 22 Chlorogensäure.

Hingegen sind einige wichtige Nutzpflanzen reich an Chlorogensäure, etwa Kartoffeln, Tomaten und Artischocken sowie die Genusspflanzen Kaffee und Tabak (Niggeweg et al. 2004; Sonnante et al. 2010; Lallemant et al. 2012).

Die positiven Eigenschaften der Chlorogensäure auf die menschliche Gesundheit sollen ebenso vielfältig sein wie bei der Rosmarinsäure, erwähnenswert seien hier die jüngst zugeschriebenen Einflüsse auf den Zucker- und Fettstoffwechsel (Liu 2013; Meng et al. 2013; Akash et al. 2014; Fuentes und Palomo 2014; Ludwig et al. 2014).

### c) Weitere Hydroxycinnamoyltransferasen

Neben diesen drei dominanten Enzymen (RAS, HQT, HST) gibt es viele andere HCTs, die eine Vielzahl pflanzlicher Ester bilden. Bekannt ist die Caftarinsäure (Caffeoyltartrat) aus der Erdnuss *Arachis glabrata*, die von einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Tartrat Hydroxycinnamoyltransferase gebildet wird (Sullivan 2014), sowie die Zichoriensäure, das DicaFFEoyltartrat (Lee und Scagel 2013). Die oben erwähnte Phaselinsäure, das Caffeoylemalat, wird im Rotklee *Trifolium pratense* von einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Malat Hydroxycinnamoyltransferase synthetisiert (Sullivan und Zarnowski 2011). Eine Reihe von Amidinen wird ebenfalls durch HCTs gebildet. Darunter fallen das 4-Cumaroylagmatin aus Gerste *Hordeum vulgare* (Bird und Smith 1983). Die 4-Cumaroyl-CoA:Agmatin N-4-Cumaroyltransferase (Agmatin-Cumaroyltransferase, ACT) ist bisher der einzige Vertreter der

vierten Klade der BAHD-Acyltransferasen. In *A. thaliana* kann sie neben 4-Cumaroylagmatin auch das Feruloyl- und das Putrescinanalogon synthetisieren (Muroi et al. 2009). Die Spermin Hydroxycinnamoyltransferase (SpmHT) und Spermidin Hydroxycinnamoyltransferase (SHT) aus *Aphelandra tetragona* katalysieren etwa die Synthese von 4-Cumaroylspermin, welches für die Bildung des makrocyclischen Polyamins Aphelandrin verwendet wird (Hedberg et al. 1996; Fellenberg et al. 2009; Grienberger et al. 2009). Diese SHT sollte nicht mit der ebenso abgekürzten Serotonin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase verwechselt werden, welche einer anderen Enzymfamilie angehört und im nächsten Kapitel vorgestellt wird. An der Suberin-Synthese sind die HHTs in Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) und vielen anderen Pflanzen beteiligt, indem sie die Veresterung von Hydroxyzimtsäure-CoA-Estern, bevorzugt das Feruloyl-CoA mit  $\omega$ -Hydroxypalmitinsäure katalysiert. Die Enzyme, die dafür verantwortlich sind, heißen Hydroxycinnamoyl-CoA: $\omega$ -Hydroxypalmitinsäure *O*-Hydroxycinnamoyltransferasen (HHTs) (Lotfy et al. 1993; Lotfy et al. 1995, 1996; Gou et al. 2009; Molina et al. 2009). Diese Enzyme sollten nicht verwechselt werden mit den Hydroxyanthranilat Hydroxycinnamoyltransferasen (ebenfalls HHT abgekürzt) aus Hafer *Avena sativa*, die für die Bildung der Avenanthramide zuständig sind.

## F. Weitere Acylierungsreaktionen in Pflanzen

Die Coenzym A-Ester vermittelte Biosynthese von Sekundärmetaboliten durch BAHD-Acyltransferasen ist zwar eine wichtige aber nicht die einzige Art, diese herzustellen (Petersen 2015).

Weitere wichtige Enzyme sind die Serin Carboxypeptidase-artigen Acyltransferasen (Milkowski und Strack 2004; Mugford et al. 2009) (Serine Carboxypeptidase-like Acyltransferases, SCPL Acyltransferasen), die sich evolutionär aus den Serin Carboxypeptidasen, also Primärstoffwechselezymen mit proteolytischer Aktivität und einer katalytischen Triade aus Serin-Histidin und Aspartat (Stehle et al. 2006) durch Duplikation und Weiterentwicklung gebildet haben. Hier erfolgt eine Übertragung eines Donors, der über Glucose aktiviert ist, meist in einem 1-*O*- $\beta$ -Glucoseester, auf einen Akzeptor. Interessant in diesem Zusammenhang sind die Kaffeesäurederivate, die durch diesen Mechanismus hergestellt werden, etwa das Sinapoyl-Malat (Lehfeldt et al. 2000) oder Sinapoyl-Cholin (Shirley et al. 2001) in *Arabidopsis thaliana*. Auch hier fängt die Biosynthese mit Phenylalanin an, welches über PAL und C4H zu 4-Cumarsäure reagiert. Dann jedoch bildet sich nach weiteren Hydroxylierungen und Methylierungen Sinapinsäure, welche mit einer UDP-Glucose:Sinapinsäure Glucosyltransferase zu Sinapoyl-Glucose reagiert (Strack 1980). Hier verzweigen sich die Biosynthesewege wie bei 4-Cumaroyl-CoA, und Sinapinsäurereste können mit Hilfe der SCPL auf die verschiedenen Akzeptoren, etwa Malat oder Cholin übertragen (Lehfeldt et al. 2000).

Die zweite Gruppe bilden die GDSL Lipase-artigen Proteine, die Coenzym A-aktivierte Hydroxyzimtsäuren verwenden (Kikuta et al. 2012) oder aber eine Übertragung von Kaffeesäure aus Chlorogensäure von Chinat auf Glucarat katalysieren (Strack und Gross 1990; Teutschbein et al. 2010). Diese Enzyme leiten sich phylogenetisch von den GDSL Lipasen ab (Akoh et al. 2004), die vornehmlich extrazellulär und im Fettstoffwechsel vorzufinden sind. Die zusätzliche katalytische Acyltransferaseaktivität ist erst jüngst entdeckt worden, so dass es noch nicht viele bekannte Reaktionen der GDSL Lipase-artigen Proteine gibt. Benannt sind die GDSL Lipasen nach den Einbuchstabencodes der Aminosäuren in der Umgebung des katalytischen Serins: Glycin-Aspartat-Serin-Leucin.

Ein weiterer Mechanismus der Acyltransferase-Reaktion wird durch GCN5-artige Enzyme durchgeführt. Diese Enzyme sind aus der Epigenetik und Genregulation und vor allem für die Modifikation von Histonen bekannt (Couture und Trievel 2006; Dekker und Haisma 2009). Daraus leiten sich die Histamin und Serotonin *N*-Hydroxycinnamoyltransferasen (THT bzw. SHT) ab, die spezifisch Kaffeesäurederivate auf Aminogruppen übertragen (Kang et al. 2006).

## **G. Ziele dieser Arbeit**

Das Ziel dieser Dissertation war, Beiträge zur Aufklärung der Biosynthese von Rosmarinsäure in *Anthoceros agrestis* zu leisten. Dabei wurden zwei Enzyme eingehend betrachtet, die PAL und die RAS. Es wurden vielfältige molekularbiologische Methoden angewandt, um die Vollständigkeitssequenzen der codierenden Gene dieser Enzyme zu erhalten und in passenden Wirtszellen zu exprimieren. Hierbei wurden verschiedene HCT-Gene in *Anthoceros* gefunden und, soweit möglich, biochemisch charakterisiert. Suspensionskulturen von *Anthoceros agrestis* wurden in einem zweiwöchigen Kulturverlauf bezüglich Wachstumsparameter, Genexpression und Enzymaktivitäten untersucht. In Erweiterung dieses Projekts wurden fünf der zwölf bekannten HCTs aus *Physcomitrella patens* nach Sequenzvergleichen mit charakterisierten HSTs/HQTs für Klonierungs- und Expressionsversuche ausgewählt. Soweit dies möglich war, wurden diese HCTs biochemisch charakterisiert.

## IV. Material und Methoden

Bei allen Arbeiten wurde stets demineralisiertes Wasser (vollentsalztes Wasser, VE-Wasser, Millipore-Wasser) verwendet.

### A. Pflanzliche Zellkulturen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei Pflanzen untersucht: *Anthoceros agrestis* (Ackerhornmoos) aus Kiel von Herrn Prof. Binding (Binding und Mordhorst 1991) und *Physcomitrella patens* (Kleines Blasenmützenmoos) aus Freiburg von Dr. Martens. Beide Pflanzen liegen als sterile Kalluskulturen auf Festmedium vor. *Anthoceros agrestis* wurde zusätzlich als Suspensionskultur in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml sterilem flüssigem Nährmedium bei 220 Umdrehungen pro Minute (UpM) geschüttelt gehalten. Die Flüssigkulturen wurden wöchentlich überimpft. Dabei wurden 5,5 g der abgetropften Kultur mit einem perforierten Löffel in einen Erlenmeyerkolben mit frischem Medium überführt. Die Kulturen wurden in einem Raum mit Umgebungslichtbedingungen sowie Temperaturen zwischen 22 und 26 °C gehalten. Für die Kalluskulturen wurde CB-M Medium verwendet. Dabei handelt es sich um ein modifiziertes CB-2 Medium (Petersen und Alfermann 1988; Gertlowski und Petersen 1993) ohne die Phytohormone 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Kinetin, Indol-3-Essigsäure (IES) und 1-Naphthylessigsäure (NAA), ohne Caseinhydrolysat (NZ-Amine) und mit 1% Saccharose. Die Suspensionskulturen wurden sowohl in CB-M als auch in CB-2 gehalten. Die *Physcomitrella*-Kulturen wurden einmal im Quartal auf frische CB-M-Agarplatten (mit 0,9% Agar-Agar) gesetzt, die *Anthoceros*-Kulturen auf Festmedium alle fünf Wochen. Dabei wurde nach Zustand der Pflanzen entschieden, ob sie überimpft wurden.

### B. Kulturcharakterisierung

Die Kulturcharakterisierung wurde mit Suspensionskulturen von *Anthoceros agrestis* durchgeführt. Dabei wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen täglich Kolben mit Zellen geerntet und verschiedene Parameter bestimmt. Tag 0 gibt dabei den Tag des Überimpfens und damit den Beginn der Kulturcharakterisierung an und entspricht, bedingt durch den wöchentlichen Zyklus des Überimpfens, dem 7. Tag des Wachstumsverlaufs. Es wurde darauf geachtet, dass zu Beginn der Charakterisierung die Zellen in eine einzige Mediumscharge überimpft werden, damit Wachstumsunterschiede, die durch Pipettierungsungenauigkeiten bei der Herstellung des Mediums auftreten können, vermieden werden. Da das Frischgewicht (FG) geringer ist als das Abtropfgewicht der Zellen wurden für die Tage 0-4 je zwei Kolben angelegt. Danach reichte das FG aus, um genügend Zellmaterial für die Experimente zu erhalten. Insgesamt waren 20 Kolben für die Kulturcharakterisierung nötig sowie zwei zusätzliche Kolben zur weiteren Erhaltung der Kultur parallel zur Charakterisierung. Nach Beginn der Charakterisierung wurden die Kolben nicht mehr überimpft, die Ernte und Verarbeitung der Zellen fand möglichst zur selben Tageszeit statt. Geerntet wurden die Zellen durch Abnutschen über Filterpapier mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe. Die Zellen wurden gewogen (Frischgewicht) und zweimal 0,5 g für die Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts und des Trockengewichts (TG) sowie weitere 0,3 g für die Expressionsanalyse abgewogen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### 1. Bestimmung der Mediumsparameter

Die Mediumsparameter geben, wie die zellulären Parameter auch, Auskunft über den Zustand der Kultur im Verlauf der Charakterisierung. Es wurden drei Parameter gemessen.



### **a) pH-Wert**

Der pH-Wert wurde nach Kalibrierung der Elektrode mit den entsprechenden Pufferlösungen bei Raumtemperatur gemessen.

### **b) Leitfähigkeit**

Die Leitfähigkeit wurde nach Kalibrierung mit Wasser mit 1:4 in Wasser verdünntem Medium bei Raumtemperatur bestimmt.

### **c) Zuckergehalt**

Der Gesamtzuckergehalt wurde nach Kalibrierung mit Wasser mit einem Refraktometer gemessen.

## **2. Bestimmung des Wassergehalts und des Trockengewichts**

Der Wassergehalt und das TG der Zellen wurden über die Massenverluste nach Trocknen des FG berechnet. Pro Kulturtag wurden dafür zweimal 0,5 g frisch abgenutzte Zellen abgewogen und bei -80 °C eingefroren. Alle Zellproben wurden in einem Gefriertrockner 24-48 Stunden getrocknet. Wenn die Proben trocken waren, wurde das TG gemessen. Aus den Durchschnittswerten des TG und dem FG wurde der Wassergehalt als absoluter und als prozentualer Anteil sowie das TG pro Kolben berechnet.

## **3. Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts**

Die getrockneten Zellen wurden für die Bestimmung des Rosmarinsäure- und Rosmarinsäure-3'-β-O-D-Glycosidgehalts (Vogelsang et al. 2006) (RA bzw. RA-Glc) verwendet. Dazu wurden die trockenen Zellen mit 2 ml 70% Ethanol versetzt, auf dem „Vortex“ gemischt und 10 Minuten bei 70 °C im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut auf dem „Vortex“ gemischt und weitere 10 Minuten bei 70 °C im Ultraschallbad inkubiert. Danach zentrifugierte man die Proben 10 Minuten bei 3000 g und entnahm 1 ml des Überstands. 10 µl des Extrakts wurden mit 90 µl HPLC-Laufmittel aus 50% Methanol/50% Wasser + 0,01% Phosphorsäure verdünnt und 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Diese Proben wurden für die HPLC-Analyse verwendet oder, wenn nötig, erneut 1:10 mit dem gleichen Laufmittel verdünnt und zentrifugiert, bevor sie über HPLC analysiert wurden.

### **a) HPLC-Analyse und Berechnung des Rosmarinsäuregehalts**

Die Rosmarinsäure- und Rosmarinsäure-Glycosidgehalte wurden mittels HPLC mit Hilfe eines quantitativen RA und eines qualitativen RA-Glc Standards gemessen. Die HPLC-Säule war eine analytische C18-RP Säule (Hauptsäule 250·4 mm, Vorsäule 20·4 mm, beide Equisil ODS 5 µm von Dr. Maisch GmbH). Der RA-Glc-Gehalt wurde unter der Annahme, dass die Absorptionseigenschaften aufgrund der gleichen phenolischen Strukturen identisch sind, mit Hilfe des RA-Standards berechnet.

$$C_p = \frac{A_p \cdot C_{Std}}{A_{Std}}$$

$C_p$  = Konzentration der Probe in nmol/20 µl

$C_{Std}$  = Konzentration des Standards in nmol/20 µl

$A_p$  = Peakfläche der Probe

$A_{Std}$  = Peakfläche des Standards

$$n_E = C_p \cdot 100 \cdot y$$

$n_E$  = Stoffmenge in nmol

100 = Faktor für das Extraktionsvolumen (2000 µl)

y = Verdünnungsfaktor (1:10 bzw. 1:100)

$$n'_E = n_E \cdot 0,001$$

$n'_E$  = Stoffmenge in µmol

$$m_E = n'_E \cdot M \cdot 0,001$$

$m_E$  = Masse in mg

M = molare Masse in µg/µmol (RA = 360,34, RA-Glc = 522,5)

0,001 = Umrechnungsfaktor

$$\%TG = \frac{m_E}{TG \cdot 1000} \cdot 100$$

%TG = Massenprozent des Metaboliten am Trockengewicht

TG·1000 = Trockengewicht des Pflanzenmaterials in mg

#### **4. Expressionsanalyse**

Pro Kulturtag wurden 0,3 g frisch abgenutzte Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die weitere Behandlung der Proben wird im Abschnitt V.D.16. behandelt.

### **C. Methoden der Enzymologie**

#### **1. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial**

Alle folgenden Arbeiten wurden, soweit möglich, auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Nach dem Abnutschen der Zellen (bzw. nach Entnahme der Proben für die RA-Extraktion und die Expressionsanalyse) wurden 3-5 g abgewogen, 1/5 des Gewichts an Polyclar 10 und das Gewicht in g als Volumen in ml an 0,1 M kaltem Kaliumphosphat-Puffer (KPi) pH 7,0 mit 1 mM Dithiothreitol (DTT) dazugegeben und vermischt. Diese Mischung wurde mit dem Ultraturrax dreimal 30 Sekunden homogenisiert, zwischen den Homogenisierungsschritten wurde der Extrakt 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden 20 Minuten bei 10000 g und 4 °C abzentrifugiert, um die lösliche Proteinfraction zu erhalten. Der Überstand wurde durch einen Trichter mit Wattestopfen filtriert. Das Filtrat wurde aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt oder zuvor einer Entsalzung über PD-10-Säulen unterzogen.

#### **2. Ammoniumsulfat-Fällung**

Die Ammoniumsulfat-Fällung ist eine Methode der selektiven Proteinpräzipitation und -konzentrierung. Dabei wird die Fähigkeit des Ammoniumsulfats ausgenutzt, die Hydrathüllen der Proteine zu stören und somit ein Ausfällen der Proteine zu erreichen. Die Ammoniumsulfat-Fällung wurde bei 80% Sättigung durchgeführt. Dazu wurde frisches Proteinrohextrakt auf Eis gerührt und schnell tropfenweise mit dem vierfachen Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. Die Ammoniumsulfat-Lösung wurde zuvor auf den pH-Wert der Proteinlösung (bzw. des Proteinextraktionspuffers) eingestellt. Nachdem die 80% Sättigung erreicht wurde, ließ man die Lösung weitere 20 Minuten rühren, um eine vollständige Fällung zu erreichen. Anschließend wurde

die Lösung bei 40000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5 ml 0,1 M KPi, pH 7 + 1 mM DTT resuspendiert. Die Lösung wurde über PD-10 Säulen entsalzt (Siehe V.C.6.) und dann für Enzymassays verwendet.

### **3. Aceton-Pulver-Extraktion**

Die modifizierte Extraktion von Proteinen nach der Aceton-Pulver-Methode wurde durchgeführt, um störende inhibierende lipophile Substanzen zu entfernen (Flurkey und Jen 1978). Dafür wurden 5 g der Zellen nach dem Abnutschen in flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert und mit 25 ml -20 °C kaltem Aceton versetzt. Die Extraktion fand 15 Minuten bei -20 °C statt. Die Zellen wurden anschließend über einen Büchner-Trichter filtriert und fünfmal mit 15 ml Aceton und zweimal mit 20 ml Diethylether (beide -20 °C) gewaschen. Die Zellen wurden im Exsiccator bei Unterdruck getrocknet (Geruchsprobe). Die weitere Proteinextraktion fand wie oben beschrieben mit 0,1 M KPi + 1 mM DTT und Polyclar 10 statt, jedoch wurde das doppelte Volumen Puffer verwendet. Diese Mischung wurde keiner weiteren Homogenisierung unterzogen, sondern direkt zentrifugiert. Anschließend fand eine Umpufferung über PD-10 statt (Siehe V.C.6.).

### **4. Extraktion heterologer Proteine aus gentechnisch veränderten *E. coli***

Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs) wurden heterolog über Nacht in *E. coli* SoluBL21 Kulturen exprimiert (Siehe V.E.7.). Die Bakterienkulturen wurden portionsweise in 50 ml Röhrchen umgefüllt und bei 4 °C für 5 Minuten und 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden auf Eis mit der vierfachen Menge des His-Tag Bindepuffers (50 mM KPi pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) mit 1 mg/ml Lysozym 30 Minuten aufgetaut. Der Aufschluss erfolgte mit einer Ultraschallsonde. Die Intensität betrug 100%, die Amplitude 0,3, die Zeit 60 Sekunden. Der Aufschluss erfolgte auf Eis. Die Suspension wurde anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 6000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für eine His-Tag Aufreinigung verwendet. Eine Probe des Pellets wurde als unlösliche Fraktion für die SDS-PAGE in Wasser rückgelöst, 20 µl des Überstandes wurden als lösliche Fraktion ebenfalls für die PAGE aliquotiert.

### **5. Affinitätsaufreinigung über Polyhistidin-Tag**

Für eine Aufreinigung mit Hilfe eines Polyhistidin- oder His-Tags wird ein Fusionsprotein mit einem künstlich angefügten Histidin-Hexamer gebildet, das über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Dieser Histidin-Tag kann sich entweder am N- oder am C-terminalen Ende des Zielproteins befinden (hier lagen nur N-terminale His-Tags vor) und sorgt dafür, dass das Zielprotein selektiv von anderen nicht markierten Proteinen getrennt werden kann. Dabei wird sich der chelatierenden Eigenschaft des Histidins bedient, an immobilisierten Nickelatomen reversibel einen Komplex zu bilden. Der Aufschluss der geernteten *E. coli*-Zellen erfolgte im His-Tag-Bindepuffer. 0,5 bis 1,0 ml des suspendierten Nickel-NTA-Säulenmaterials wurden in Plastiksäulen pipettiert und mehrmals mit Wasser gespült. 1 ml His-Tag-Bindepuffer wurde zum Säulenmaterial gegeben und dieses mindestens 10 Minuten äquilibriert. Der Puffer wurde entfernt und bis zu 10 ml der Proteinlösung auf die Säule gegeben. Diese wurde verschlossen und, von Eis bedeckt, eine Stunde sanft geschwenkt. Danach wurde die Flüssigkeit abgelassen (Durchlauf); 2-3 Tropfen des Durchlaufs wurden für die PAGE entnommen. Das Säulenmaterial wurde anschließend achtmal mit 2 ml His-Tag-Waschpuffer 1 (50 mM KPi pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Bei Bedarf wurden zwei weitere Waschschrte mit je 1 ml vom Waschpuffer 2 (50 mM KPi pH 8,0, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol) durchgeführt. 2-3 Tropfen vom 1., 8. und 10. Waschschrte wurden für die PAGE aliquotiert.

Die Elution des Proteins erfolgte in drei Schritten mit je 1 ml des Elutionspuffers (50 mM KPi pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol). Von jedem Waschschrift wurden 2-3 Tropfen für die PAGE entnommen, die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und über die PD-10 Säule entsalzt. Das NiNTA-Säulenmaterial wurde mit 1 ml 0,2 M Essigsäure gereinigt und mit Wasser gespült, bis kein Essiggeruch mehr wahrnehmbar war. Die Lagerung im Kühlschrank erfolgte in einer 20%igen Ethanollösung.

## **6. Größenausschlusschromatographie über PD-10 Säulen (Entsalzung)**

Außer bei den Proteinextrakten des Kulturverlaufs wurde mit sämtlichen Proteinextrakten eine PD-10 Aufreinigung durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben (GE Healthcare) gearbeitet: Die PD-10 Säulen wurden mit 25 ml 0,1 M KPi pH 7,0 mit 1 mM DTT äquilibriert. 2,5 ml der Proteinlösung wurden zugesetzt und mit 3,5 ml des Puffers (0,1 M KPi pH 7,0, 1 mM DTT) eluiert, diese Fraktion wurde gesammelt. Die Säulen wurden anschließend mit 25 ml Wasser gespült und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Proteinfraction wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

## **7. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Der Bradford-Test (Bradford 1976) dient der photometrischen Quantifizierung einer Proteinlösung über eine Kalibriergerade eines Proteins bekannter Konzentration. Die Bradford-Lösung wurde folgendermaßen angesetzt:

- 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250
- 50 ml 96% Ethanol
- 100 ml 85% o-Phosphorsäure
- 850 ml Wasser

Die Lösung wurde zweimal filtriert und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. 2 ml der Bradford-Lösung wurden in Einweg-Makroküvetten aus Acrylglas gegeben. Zu dieser Lösung wurden 20 µl Probelösung pipettiert, für den Referenzwert (KPi)-Puffer, für die Standardreihe eine BSA-Lösung mit 0,25 bis 1 mg/ml BSA in Wasser mit Stufen in 0,25 mg/ml Schritten, und für die unbekannten Proteinproben wurden unverdünnte bzw. 1:10 mit Puffer verdünnte Proben verwendet. Die Messansätze für die Standardlösungen und die unbekannten Proben wurden in doppelter Ausführung erstellt, der Referenzwert wurde in einfacher Ausführung angefertigt. Da die Komplexbildungsreaktion des Coomassie Brilliant Blue mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine eine zeitabhängige Reaktion ist, wurde darauf geachtet, dass die Zugabe der Proteinlösungen zu den Küvetten und die anschließende Mischung entsprechend den technischen Vorgaben des Photometers zeitlich gestaffelt stattfand. Die Mischung wurde außerdem nach 10-15 Minuten vermessen, um dem Zerfall des Komplexes zuvorzukommen. Die Daten der Kalibrierproben wurden gemittelt und in einem Koordinatensystem mit der Absorption auf der Ordinate und der Konzentration in mg/ml auf der Abszisse aufgetragen. Die Verbindung der Koordinatenpunkte resultiert in einer Geraden, idealerweise mit dem Schnittpunkt im Ursprung. Die Absorptionswerte der unbekannten Probe liegen zwischen denen der Kalibriergerade und haben Zahlenwerte zwischen 0,1 und 1, andernfalls wurde die unbekannte Probe entsprechend verdünnt. Mit Hilfe der Geradengleichung können nun die Konzentrationen der gemittelten Werte berechnet werden.

## 8. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, Makromoleküle aufgrund ihrer Größe in einem elektrischen Feld in einer Gel-Matrix zu trennen. Die Trennung beruht dabei auf dem Prinzip des Molekularsiebs: Große Makromoleküle haben in der Matrix eine kleinere Mobilität als kleine Moleküle, da sie in dieser Matrix aufgehalten werden. Dadurch befinden sich nach dem Lauf einer Elektrophorese die kleinen Makromoleküle am weitesten vom Ausgangspunkt entfernt, die großen Makromoleküle sind diesem Punkt näher. Üblicherweise wird ein Größenmarker mit definierten Größen gesondert mit aufgetragen, um eine annähernde Bestimmung der Größe zu ermöglichen.

Die SDS-PAGE (Laemmli 1970) ist dabei eine Methode, denaturierte Proteine allein aufgrund ihrer Größe in einem Gel zu trennen. Die Proteine werden mit Mercaptoethanol reduziert und mit Hitze denaturiert, gleichzeitig bildet sich eine Schicht SDS um die Peptidkette, die proportional zur Größe des Proteins ist (1 g Protein interagiert dabei mit 1,4 g SDS). Dadurch haben die Aminosäureseitenketten keinen Einfluss auf das Laufverhalten, sondern nur die Masse des Proteins. Es wurden 10 µl der aliquotierten Proteinlösungen der His-Tag-Aufreinigung mit einem Überschuss von 5 µl des 4x Roti®-Load-Probenpuffers vermischt und bei 95 °C für 10 Minuten erhitzt. 10 µl der Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen. Das SDS-Gel bestand aus einem (unteren) Trenngel und einem (oberen) Sammelgel, deshalb handelt es sich um ein diskontinuierliches Gel. Die Gelbildung ist eine radikalische Reaktion, bei der der Polymerisationsstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS) mit dem Katalysator Tetramethylethyldiamid (TEMED) versetzt zur Polymerisation des Acrylamids zu Polyacrylamid führt. Um eine Quervernetzung der ansonsten linearen Acrylamidkette zu erhalten, wird ein Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 37,5:1 gewählt.

Zusammensetzung des Trenngels (für zwei Gele, in dieser Reihenfolge)

2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

2,9 ml Wasser

4,1 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5:1)

400 µl 10% SDS

16 µl TEMED p.a.

70 µl 10% APS

Nach dem Einfüllen des Gels zwischen die Glasplatten wurde die Oberfläche mit 400 µl n-Butanol überschichtet. Dieser wurde vor Zugabe des Sammelgels vollständig entfernt.

Zusammensetzung des Sammelgels (für zwei Gele, in dieser Reihenfolge)

1,25 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

2,8 ml Wasser

750 µl 30% Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5 : 1)

200 µl 10% SDS

10 µl TEMED p.a.

40 µl 10% APS

Die Gelmischung wurde, nachdem das APS zugefügt wurde, 20 Sekunden intensiv gemischt und in die vorbereiteten Kammern gegossen. Dazu wurden zuvor die Glasplatten und Spacer mit Ethanol entfettet, staubfrei gereinigt und bündig in die Vorrichtungen gespannt. Das noch flüssige Gel wurde

mit einer Pipette zwischen die Glasplatten eingefüllt und dort sauerstofffrei auspolymerisiert. Die Gele waren etwa 8 cm lang (Sammel- und Trenngel), 8,5 cm breit und 2 mm dick. Die Gele wurden bis zur Verwendung feucht in Papiertücher und Kunststoffolie gewickelt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Als Standard wurde i.d.R. der Roti®-Mark Standard verwendet die Größe der Standardproteine lag zwischen 10 und 150 bzw. 14 und 212 kDa. Die Gele wurden bei 150 V und 100 mA für 2-2,5 Stunden laufen gelassen. Der Lauf war beendet, wenn die untere blaue Bande (Bromphenolblau) des Größenmarkers die untere Kante des Gels durchlaufen hatte. Der Laufpuffer bestand aus 192 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,1% SDS, der pH-Wert wurde auf 5,3 eingestellt. Nach dem Lauf wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 0,5–1 h im Färbebad gefärbt. Das Färbebad bestand aus 0,3 mM Coomassie-Brilliant Blue R-250 in Methanol:Essigsäure:Wasser 4,5:1:4,5. Die anschließende zweifache Entfärbung (je 0,5-1 Stunde) erfolgte im gleichen Lösungsmittelgemisch ohne Coomassie Blau. Die entfärbten Gele wurden in Saran®-Folie eingeschlagen und fotografiert.

## **9. Bestimmung von Enzymaktivitäten**

*In vitro*-Enzymaktivitätstest können entweder als Verlaufstest oder kinetische Assays stattfinden oder ein Endpunktassay sein. Der kinetische Assay zeichnet sich dadurch aus, dass die Messungen mehrmals im Verlauf der Reaktion stattfinden und man somit ein Bild des Reaktionsverlaufs hat. Der Endpunktassay hingegen ist dadurch charakterisiert, dass die Reaktion nach einer bestimmten Inkubationszeit beendet wird und das resultierende Produkt bzw. ein Reportermolekül nachgewiesen wird. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Endpunktassays für die Enzymtests angewandt, die dann mittels HPLC (siehe V.C.11.) untersucht wurden. Dabei wurde das Reaktionsprodukt als Analyt verwendet. Es wurden stets parallel durchgeführte Nullproben verwendet. Diese bestehen aus Proben, die ohne Inkubation mit Salzsäure versetzt und direkt auf Eis gekühlt wurden („stop before start“). Die Verlaufstests wurden am Photometer durchgeführt.

Die einzelnen Enzymaktivitätstest sahen folgendermaßen aus (Weitzel und Petersen 2010; Sander und Petersen 2011; Weitzel und Petersen 2011):

### **a) Phenylalanine Ammoniak-Lyase (PAL)**

Gesamtvolumen 250 µl

190 µl Borsäure-Borax-Puffer (78 mM Borsäure, 30 mM Borax, 20 mM NaCl, pH 8,8)

50 µl 0,1 M L-Phenylalanin in Borsäure-Borax-Puffer

Der Test wurde mit 10 µl Enzymrohextrakt gestartet und bei 36 °C inkubiert. In Vorversuchen wurde eine Zeitreihe von 0-30 Minuten, bei den Proben der Kulturverläufe Inkubationszeiten von 0 und 10 Minuten verwendet. Das Abstoppen erfolgte mit 50 µl 6 M HCl und Kühlung auf Eis. Das Reaktionsprodukt wurde zweimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphasen abgehoben und vereinigt und das Lösungsmittel evaporiert.

### **b) 4-Cumarat:Coenzym A Ligase (4CL)**

Der 4CL-Test ist ein photometrischer Test, der in Quarzküvetten durchgeführt wird. Als Referenzküvette dient eine Reaktionsmischung mit Wasser statt dem Enzymextrakt. Die Reaktion

findet in einem beheizten Küvettenblock im Photometer statt. Gemessen wird die Absorption des sich bildenden Hydroxyzimtsäure-CoA-Esters der Probe gegen die Referenz. Die eingestellte Wellenlänge richtet sich nach der verwendeten Hydroxyzimtsäure.

Gesamtvolumen 500 µl

430 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,5

25 µl 10 mM Hydroxyzimtsäurederivat (in 50% Methanol)

4-Cumarsäure: Messung bei 333 nm

Kaffeesäure: Messung bei 346 nm

10 µl 125 mM ATP

10 µl 125 mM MgCl<sub>2</sub>

5 µl 0,1 M DTT (bei 4-Cumarsäure) bzw. Wasser (bei Kaffeesäure)

Die Küvetten werden 5 Minuten im Küvettenhalter im Photometer auf 40 °C vorgewärmt, dann werden 15 µl Enzymrohextrakt (Proben) bzw. Wasser (Referenz) zugegeben. Die Reaktion wird mit 5 µl 10 mM Coenzym A in beiden Küvetten gestartet und bei 40 °C inkubiert. Es werden über 15 Minuten alle 30 Sekunden Messwerte ermittelt.

### **c) Tyrosin Aminotransferase (TAT)**

Gesamtvolumen 250 µl

163 µl 1 M Tris/HCl-Puffer pH 9,0

10 µl 2 mM Pyridoxalphosphat

20 µl 400 mM α-Ketoglutarat

50 µl Enzymrohextrakt

Der Test wurde mit 7 µl 150 mM L-Tyrosin (in 0,5 M HCl) gestartet und bei 40 °C inkubiert. Das Abstoppen erfolgte mit 100 µl 6 M HCl und Kühlung auf Eis. Das Reaktionsprodukt wurde zweimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphasen abgehoben und vereinigt und das Lösungsmittel evaporiert.

### **d) Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)**

Gesamtvolumen 250 µl

150 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0

10 µl 0,1 M DTT

10 µl 1 mM Ascorbinsäure

10 µl 50 mM NADPH+H<sup>+</sup>

20 µl 25 mM pHPP (in 20% Ethanol)

Der Test wurde mit 50 µl Enzymrohextrakt gestartet und bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden in Zeitreihen von 0-60 Minuten inkubiert. Das Abstoppen erfolgte mit 25 µl 6 M HCl und Kühlung auf Eis. Das Reaktionsprodukt wurde zweimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphasen abgehoben und vereinigt und das Lösungsmittel evaporiert.

### e) Hydroxycinnamoyltransferasen (HCT)

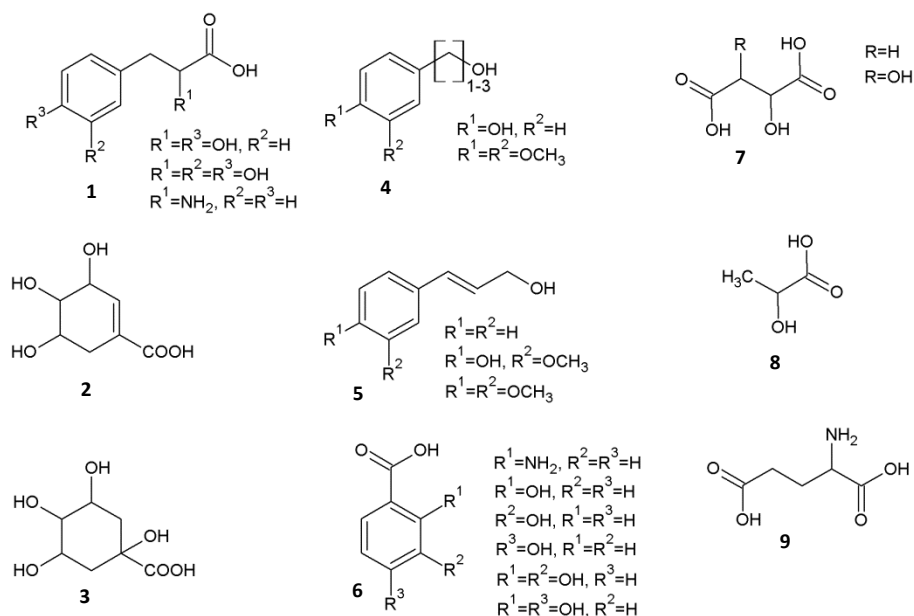
Gesamtvolumen 125 µl  
67,5 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0  
12,5 µl 0,1 M DTT  
10 µl 12,5 mM Ascorbinsäure  
5 µl 20 mM Akzeptor (in 20% Ethanol)  
10 µl 2,5 mM Donor

Der Test wurde mit 20 µl Enzymrohextrakt gestartet und bei 30 °C inkubiert. Die Enzymtests mit Enzymrohextrakten wurden in Zeitreihen von 0-24 h, i.d.R. von 0-60 min inkubiert. Heterolog exprimierte Proteine wurden für 0 und 30 Minuten inkubiert. Das Abstoppen erfolgte mit 20 µl 6 M HCl und Kühlung auf Eis. Das Reaktionsprodukt wurde zweimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphasen abgehoben und vereinigt und das Lösungsmittel evaporiert.

Bei den verwendeten Akzeptoren (Abb. 23) handelte es sich um

DL-4-Hydroxyphenylmilchsäure (pHPL)	Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure)
DL-3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure (DHPL)	3-Hydroxybenzoesäure
D-Phenylalanin	4-Hydroxybenzoesäure
L-Phenylalanin	2,3-Dihydroxybenzoesäure
Shikimisäure	2,4-Dihydroxybenzoesäure
Chinasäure	DL-Äpfelsäure
4-Hydroxybenzylalkohol	D-Weinsäure
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	L-Weinsäure
3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol	DL-und meso-Weinsäure
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-propanol	D-Milchsäure
<i>t</i> -Zimtalkohol	L-Milchsäure
Coniferylalkohol	DL-Milchsäure
3,4-Dimethoxy-Zimtalkohol	L-Glutaminsäure
Anthranilsäure (2-Aminobenzoessäure)	





**Abbildung 23** Schematische Darstellung der verwendeten Akzeptoren (Nennungen unter jeder Ziffer jeweils von oben nach unten): 1 = pHPL, DHPL, Phenylalanin, 2 = Shikimisäure, 3 = Chinasäure, 4 = 4-Hydroxybenzylalkohol, 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol, 3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol, 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-propanol, 5 = *t*-Zimtalkohol, Coniferylalkohol, 3,4-Dimethoxy-Zimtalkohol, 6 = 2-Aminobenzoessäure, 2-Hydroxybenzoessäure, 3-Hydroxybenzoessäure, 4-Hydroxybenzoessäure, 2,3-Dihydroxybenzoessäure, 2,4-Dihydroxybenzoessäure, 7 = Äpfelsäure, Weinsäure, 8 = Milchsäure, 9 = Glutaminsäure.

Bei den Donoren handelte es sich in der Regel um Caffeoyl-CoA. In Kombination mit pHPL und DHPL wurde daneben auch 4-Cumaroyl-CoA verwendet. Diese vier Assays (Caffeoyl-CoA oder 4-Cumaroyl-CoA mit pHPL oder DHPL) werden RAS-Assays genannt, da spezifisch auf Aktivität der Rosmarinsäure Synthase geprüft wird. Assays, in denen Chinasäure als Akzeptor verwendet wird, sind HQT-Assays, bei Shikimisäure spricht man von HST-Assays. Alle übrigen Kombinationen von Akzeptor und Donor werden hier einfach als HCT-Assay bezeichnet. Der Assay wurde mit den oben genannten Standardbedingungen auch mit Caffeoyl-Glucose als Donor und pHPL als Akzeptor durchgeführt.

Der HCT-Test wurde mit verschiedenen anderen Parametern durchgeführt. Diese Abwandlungen sahen eine Änderung des Puffersystems (Tris-HCl, Acetatpuffer, Borsäure-Borax-Puffer) oder des Puffer pH-Werts (pH 6,0 bis 8,0 in 0,5 Schritten), eine Änderung der Substratkonzentration des Caffeoyl-CoA (40 bzw. 200  $\mu$ M Endkonzentration), Kombinationsassays mit biosynthetisch vorgelagerten Reaktionsschritten (HPPR- bzw. 4CL-Assay mit HCT-Assay kombiniert), eine Änderung der Inkubationstemperatur (25-42  $^{\circ}$ C in 2 bis 3  $^{\circ}$ -Schritten), der Enzymmenge (10 bis 50  $\mu$ l) und der Inkubationszeit (5 Minuten bis 24 h) und Zugabe von anderen Cofaktoren und Metallionen vor:

#### Messreihe A

NADH+H<sup>+</sup>, 50 mM, 5  $\mu$ l  
 NADPH+H<sup>+</sup>, 50 mM, 5  $\mu$ l  
 Ascorbinsäure, 125 mM, 5  $\mu$ l  
 CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 Fe(III)Cl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O; 125 mM, 1  $\mu$ l  
 NiSO<sub>4</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 MnCl<sub>2</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l

#### Messreihe B

Ascorbinsäure, 125 mM, 5  $\mu$ l  
 ATP, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l

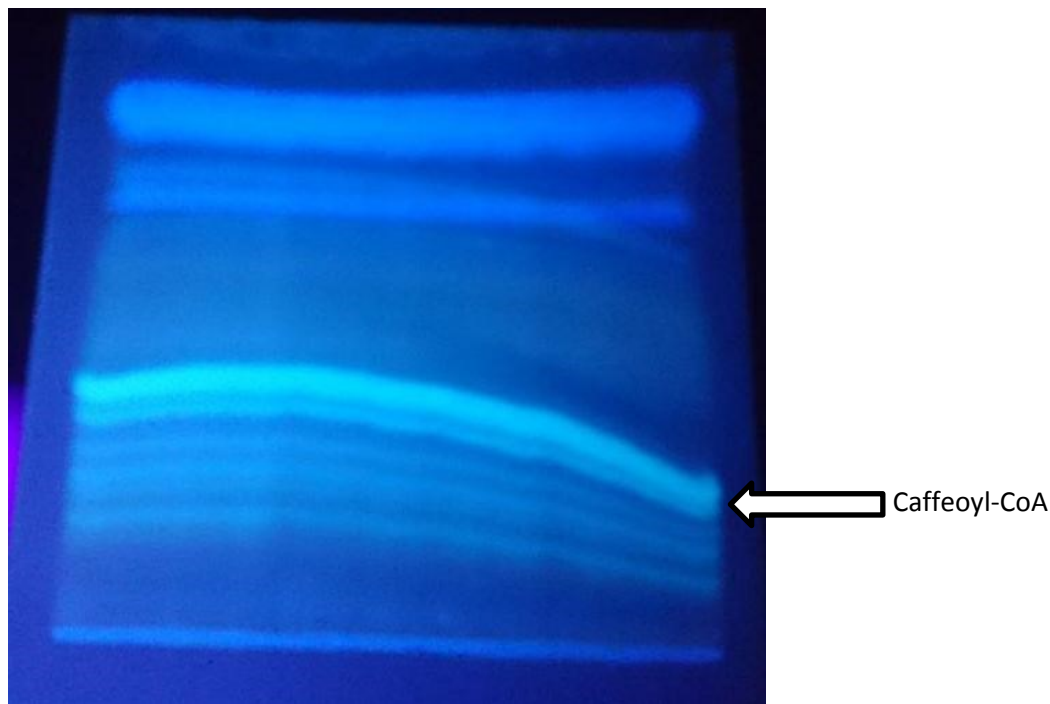
#### Messreihe C

Nicotinsäure, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 ATP, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 Pyridoxalphosphat, 2 mM, 1  $\mu$ l  
 Ascorbinsäure, 125 mM, 5  $\mu$ l  
 Coenzym A, 2,5 mM, 10  $\mu$ l  
 Riboflavin, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 Thiamin, 125 mM, 1  $\mu$ l  
 NAD<sup>+</sup>, 50 mM, 5  $\mu$ l  
 NADP<sup>+</sup>, 50 mM, 5  $\mu$ l  
 MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 125 mM, 1  $\mu$ l

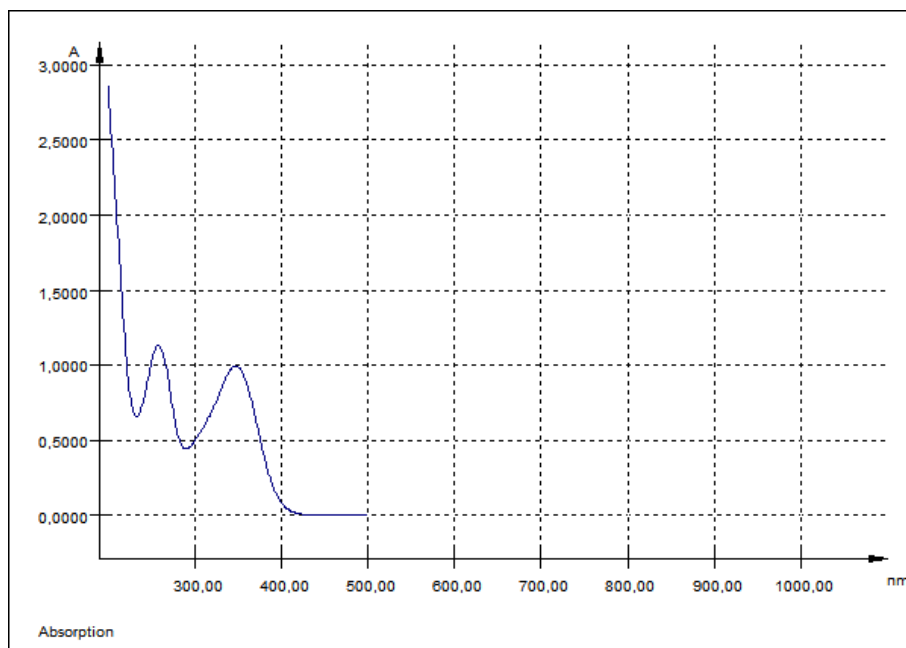
Das Stoppen mit Salzsäure und Ausschütteln mit Ethylacetat wurde weggelassen, wenn mit heterolog exprimiertem Protein hohe Durchsätze an Enzymassays erreicht werden mussten. Dabei wurde nach der Inkubation das gleiche Volumen der Reaktionsmischung (125  $\mu$ l) an Methanol mit 0,02% Phosphorsäure zugesetzt und auf Eis abgestoppt. Alle Veränderungen der Volumina einzelner Parameter wurden durch Zusatz oder Abzug des entsprechenden Lösungsmittels in der Reaktionsmischung ausgeglichen.

#### (1) Synthese von Caffeoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA

Caffeoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA wurden chemisch aus den Succinimidestern der entsprechenden Hydroxyzimtsäuren dargestellt (Stöckigt und Zenk 1975). Dafür wurden 25,2 mg Natriumhydrogencarbonat, 23 mg Coenzym A sowie 56 mg Caffeoyl-Succinimidester (oder 4-Cumaroyl-Succinimidester, aus der Laborsammlung) abgewogen. Das  $\text{NaHCO}_3$  wurde in 6 ml Wasser gelöst, und mit einem leichten Stickstofffluss wurde 15 Minuten die Luft aus der Lösung vertrieben. 1 ml der Natriumhydrogencarbonatlösung wurde entnommen und damit das Coenzym A gelöst. Die Coenzym A-Lösung wurde tröpfchenweise in die Natriumhydrogencarbonatlösung pipettiert und erneut 15 Minuten mit Stickstoff durchgast. Der Succinimidester wurde in 1 ml Aceton p.a. gelöst und dieser in die Coenzym A-Lösung pipettiert, welche sich dadurch trübte. Unter weiterem Stickstofffluss wurde Aceton zu der Lösung gegeben, bis die Lösung wieder klar wurde. Das Reagenzglas wurde verschlossen und im Dunkeln über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde mit Stickstoff das Aceton vertrieben, bis das organische Lösungsmittel vollständig entfernt war. Die trübe Flüssigkeit wurde auf mehrere 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 16000 g 5 Minuten zentrifugiert. Die klare gelbe Flüssigkeit wurde vereinigt, eingengt und auf Cellulose DC-Platten aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht in mit BAW-gesättigten Kammern (n-Butanol:Essigsäure:Wasser 5:2:3 als einphasige Lösung, dazu Essigsäure in Wasser lösen und diese langsam zu Butanol unter Rühren einbringen) laufen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Platten aus der DC-Kammer entnommen, getrocknet und die Caffeoyl-CoA-Bande unter UV-Licht markiert. Der Rf-Wert liegt bei 0,3, die Doppelbande leuchtet bei 366 nm bläulich (Abb. 24). Die Cellulose wurde an den entsprechenden Stellen abgekratzt und mit Wasser extrahiert, bis die UV/VIS-Spektren auf keine nachweisbaren Mengen des CoA-Esters deuteten. Die Spektren wurden in Quarz-Küvetten gegen Wasser als Referenz im Bereich zwischen 200 und 500 nm gemessen. Caffeoyl-CoA hat Absorptionsmaxima bei 280 und 346 nm (Abb. 25), 4-Cumaroyl-CoA bei 280 und 333 nm. Die wässrigen Extrakte wurden vereinigt und eingengt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei den genannten Wellenlängen ( $\epsilon_{\text{Caffeoyl-CoA}} = 18 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $\epsilon_{4\text{-Cumaroyl-CoA}} = 21 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Die Lösungen wurden auf 2,5 mM eingestellt.



**Abbildung 24** Dünnschichtchromatogramm von Caffeoyl-CoA unter UV-Licht (312 nm). Stationäre Phase Cellulose, mobile Phase n-Butanol:Essigsäure:Wasser 5:2:3.



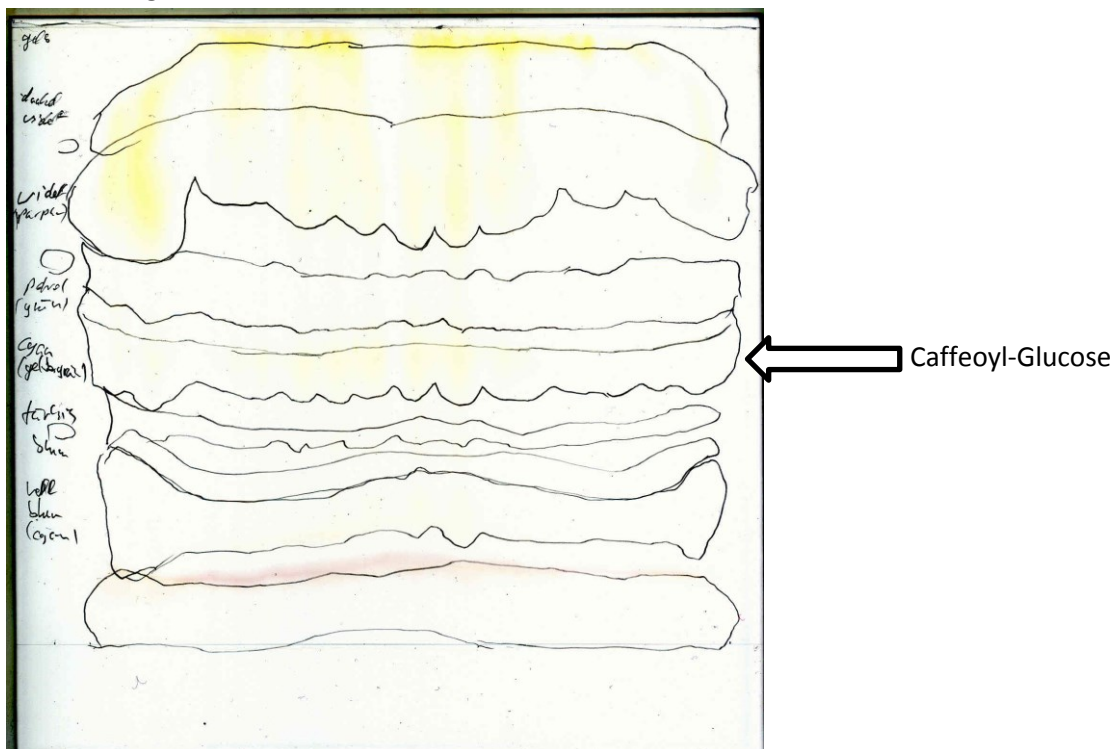
**Abbildung 25** Absorptionsspektrum von Caffeoyl-CoA in Wasser.

## (2) Extraktion von Caffeoyl-Glucose

Diese Methode (Harborne und Janet Corner 1961; Strack 1977; Strack et al. 1987) bedient sich der Biotransformation von Hydroxyzimtsäuren durch Radieschenkeimlinge.

Kommerziell erhältliche Radieschensamen (*Raphanus sativus* var. *sativus*) wurden in einer Petrischale mit zwei Lagen Filterpapier in 20 ml Wasser im Dunkeln bei 20-25 °C zum Keimen gebracht. Nach einem Tag wurde das Wasser vollständig abpipettiert und durch 15 ml einer 50 mM Kaffeesäurelösung ersetzt. Dazu wurden 0,135 g Kaffeesäure in 2 ml Ethanol gelöst und mit 0,1 M KPi pH 6,5 auf 15 ml aufgefüllt. Nach 16 Stunden Inkubation wurden die Keimlinge gewogen und 6,38 g

des Materials mit 80 ml 80% Methanol mit dem Ultraturrax für eine Minute homogenisiert. Der Homogenisierstab wurde mit weiteren 20 ml 80% Methanol gereinigt, diese Lösung wurde mit dem Homogenat vereinigt. Das Homogenat wurde filtriert und das Filtrat bis zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde in mehreren Schritten mit 3 ml 80% Methanol rückgelöst. Die Lösung wurde auf präparativen Cellulose DC-Platten aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen dienten 10 mM Lösungen von Kaffeesäure und Rosmarinsäure. Die Platten wurden über Nacht (16 h) in BAW-gesättigten DC-Kammern laufen gelassen. Dazu wurden n-Butanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 4:1:5 intensiv auf dem Magnetrührer gemischt. Nach dem Mischen wurde die organische wassergesättigte Phase im Scheidetrichter abgenommen und als Laufmittel verwendet. Nach dem Trocknen der Platten am darauffolgenden Morgen wurden die Platten unter UV-Licht bzw. nach Bedampfung mit Ammoniak unter UV-Licht betrachtet. Die Caffeoyl-Glucose hat einen Rf-Wert von 0,5 und ist als blau-violette bzw. nach Ammoniakbehandlung als grün-gelbe Bande zu erkennen (Abb. 26). Diese Bande wurde von der DC-Platte abgekratzt und das Cellulosematerial dreimal mit Wasser extrahiert (erstes Mal 2 ml, zweites und drittes Mal 1,5 ml). Die Proben wurden auf dem „Vortex“ geschüttelt und zentrifugiert, der Überstand wurde gesammelt. Zur Kontrolle der vollständigen Extraktion aus dem Chromatographiematerial und zur weiteren Identifizierung des Produkts wurden UV/VIS-Spektren des Überstands gegen Wasser und gegen Ethanol aufgenommen. Caffeoyl-Glucose besitzt ein Maximum bei 326-328 nm sowie eine Schulter bei 240 nm in Wasser sowie Maxima bei 338 und 245 nm in Ethanol. Da eine Messung mit HPLC eine starke Verunreinigung aufwies, wurde das Produkt erneut mittels DC aufgetrennt und gereinigt. Erneut wurden Identität und Reinheit geprüft. Die nun saubere Caffeoyl-Glucose wurde im Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Da eine Referenzprobe fehlte, wurde die Substratkonzentration mit Kaffeesäureproben bekannter Konzentration mittels HPLC auf 0,88 mM abgeschätzt. Die Caffeoyl-Glucose wurde wie oben beschrieben im HCT-Assay mit pHPL als Akzeptor verwendet, es wurden jedoch 30 µl Caffeoyl-Glucose eingesetzt.



**Abbildung 26 Dünnschichtchromatogramm von Caffeoyl-Glucose.** Stationäre Phase Cellulose, mobile Phase n-Butanol:Essigsäure:Wasser 4:1:5 (organische Phase).

### (3) HCT-Test mit Ellmans Reagenz

Eine weitere Variation des HCT-Aktivitätsnachweises betraf die Wahl eines photometerbasierten Detektionssystems (Ellman 1959).

Dabei wird die Fähigkeit des Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) verwendet, durch Thiole gespalten zu werden. Das entstehende 2-Nitro-5-Thiobenzoat kann bei 412 nm detektiert werden.

Wichtig bei diesem Nachweis ist die Abwesenheit zusätzlicher störender Thiole, deshalb wurde auf DTT im Extraktionspuffer und im Assay verzichtet.

Gesamtvolumen 500 µl

330 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0

20 µl 2,5 mM Caffeoyl-CoA

20 µl 12,5 mM Ascorbinsäure

10 µl 20 mM pHPL (in 20% Ethanol)

100 µl 2 mM DNTB in KPi

Die Küvetten wurden auf 37 °C aufgewärmt. Der Start erfolgte mit 20 µl Enzymrohextrakt zu den Probenküvetten und Wasser zu den Referenzküvetten, die Messung bei 412 nm erfolgte mit einem Messpunkt alle 30 Sekunden.

## 10. Kinetische Messungen

Die kinetischen Parameter einer enzymatischen Reaktion können folgendermaßen beschrieben werden (Michaelis und Menten 1913):



E = Enzym

S = Substrat

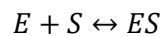
P = Produkt

ES = Enzym-Substrat-Komplex

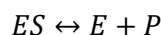
EP = Enzym-Produkt-Komplex, wobei die Umwandlung zwischen ES und EP für die Kinetik vernachlässigt werden kann:



Für die Reaktion



ist die Assoziationskonstante  $k_1$ , die Dissoziationskonstante  $k_{-1}$ . Die Dissoziation der Reaktion



wird mit  $k_2$  angegeben. Enzymreaktionen finden unter Annahme eines Fließgleichgewichts statt. Hierbei kann  $k_2$  vernachlässigt werden, denn  $k_1 = k_{-1} \gg k_2$ . Für die Reaktionsgeschwindigkeit gilt nun

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Diese Funktion ergibt eine Hyperbel, das Maximum wird bei Substratsättigung erreicht.  $V_{\max}$  ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Sättigung. Der  $K_m$ -Wert ist eine enzym- und substratspezifische Konstante, die die Substratkonzentration angibt, bei der das Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit/Sättigung erreicht hat. Die Bestimmung der Werte für  $K_m$  und  $V_{\max}$  erfolgt experimentell. Dabei wird die Substratkonzentration sukzessive von einer geringen Konzentration erhöht bis sie im Überschuss vorliegt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei die spezifische Enzymaktivität.

Die  $K_m$ -Werte für PAL und TAT wurden aus Enzymrohextrakten bestimmt. Es handelt sich deshalb um apparente Werte, da interagierende Enzymreaktionen nicht ausgeschlossen werden können. Für PAL betrug die Konzentrationsspanne 10 bis 400  $\mu\text{M}$  L-Phenylalanin in der Endkonzentration. Da die TAT zwei Substrate braucht, wurde für jedes Substrat ein eigener Wert gemessen, das zweite Substrat lag dann jeweils im Überschuss vor. Für Tyrosin lag die Spanne zwischen 1 und 6 mM, für  $\alpha$ -Ketoglutarat von 1 bis 40 mM. Die geringe Löslichkeit des Tyrosins bewirkt, dass keine Sättigung erreicht werden kann, dadurch ist der apparente  $K_m$ -Wert sowohl für Tyrosin als auch für  $\alpha$ -Ketoglutarat nur eine Annäherung. Da die Messung im linearen Bereich des Reaktionsverlaufs und bei vernachlässigbaren Änderungen der Substrat- und Produktkonzentration stattfinden muss, wurden kurze Reaktionszeiten von einer Minute bei TAT und 5 Minuten bei PAL gewählt. Bei den Nullproben wurde das Substrat weggelassen, die Inkubation fand wie bei den anderen Proben statt. Auch hier wurden Änderungen der Volumina einzelner Reaktanden durch Zugabe des entsprechenden Lösungsmittels ausgeglichen. Die Auswertung von Enzymkinetiken erfolgt in der Regel graphisch in einer linearisierten Darstellung der Hyperbelfunktion. Die einfachste Form stellt hierbei das Lineweaver-Burk-Diagramm dar (Lineweaver und Burk 1934). Es handelt sich dabei um eine doppelt-reziproke Darstellung von Geschwindigkeit gegen Konzentration, mit  $K_m$  als negativem reziprokem Schnittpunkt der Gerade mit der x-Achse. Die starken Abweichungen, die geringe Substratkonzentrationen auf die Gerade ausüben können, sind ein Nachteil der Lineweaver-Burk-Darstellung. Deshalb wurde die Hanes-Woolf-Darstellung gewählt (Hanes 1932), die eine Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Geschwindigkeit gegen die Substratkonzentration darstellt. Hierbei ist  $K_m$  der negative Wert des Schnittpunkts der Gerade mit der x-Achse. Ein Nachteil des Hanes-Woolf-Diagramms ist das Fehlen unabhängiger Parameter, da die Substratkonzentration sowohl in der x- als auch in der y-Achse verwendet wird. Jedoch ist sie zur schnellen Auswertung und Darstellung der Kinetik geeignet und gebräuchlich.

## **11. HPLC-Analyse von Enzymreaktionsprodukten**

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) ist eine wichtige Methode der Trennung und Reinigung von Substanzen im Labor. Diese werden mit Hilfe von Pumpen über Kapillaren in einem Laufmittelstrom auf eine Säule geladen, getrennt und anschließend detektiert. Die HPLC-Analytik braucht hohe Laufmitteldrücke, in der Regel zwischen 200 und 400 bar, abhängig vom Laufmittel, der Flussrate und der Säule. Dabei können viele verschiedene HPLC Systeme benutzt werden: Es gibt beispielsweise analytische, semi-quantitative oder quantitative HPLCs, isokratische oder Gradienten-Laufmittelzufuhr, Normalphase (NP) oder Reversphase (RP), UV/VIS Detektor (meist mit Dioden-Array Detektor kombiniert) und/oder MS. Bei den hier verwendeten Methoden handelt es sich um eine analytische C18-RP Säule (Hauptsäule 250·4 mm, Vorsäule 20·4 mm, beide Equisil ODS 5  $\mu\text{m}$  von Dr. Maisch GmbH) mit isokratischem Laufmittelfluss und UV/VIS-Detektor. Für die HPPR-Tests wurde auch eine ReproSil Pur C18-AQ Säule (250·4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) von Grom verwendet. Die Laufmittelzusammensetzung war abhängig von der Hydrophobizität des nachzuweisenden Produkts, je hydrophiler die Substanz war, desto höher war der Wasseranteil im Verhältnis zu Methanol (Tabelle 4). Alle Laufmittel erhielten einen Zusatz von 0,01% o-Phosphorsäure oder 0,25% Eisessig. Das Wasser wurde vor Verwendung gefiltert, um Staub und Schwebstoffe zu entfernen. Das Laufmittel wurde für 10 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt, um Luftbläschen zu entfernen.

**Tabelle 4 HPLC-Parameter für die Analyse von Metaboliten und Enzymaktivitäten.**

% MeOH mit 0,01% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	% H <sub>2</sub> O Mit 0,01% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Flussrate [ml/min]	Wellenlänge [nm]	Standard	Standardkon- zentration [µM]	Assay
50	50	1	333	Rosmarinsäure	50	Zellextrakte
50	50	1	333/280	Caff-pHPL	100	RAS
40	60	1	333/280	Chlorogensäure	100	HQT
35	65	1	333/280	Caff-Shikimat	25	HST
50/40/35	50/60/65	1	333/280	-	-	HCT
25	75	1	280	Kaffeesäure	50	Caff-Glc
50	50	1	290	t-Zimtsäure	50	PAL
50	50	1	280	pHPP	200	TAT
50/40/30	50/60/70	0,7-1	280	pHPL	800	HPPR

Die eingetrockneten Rückstände der ausgeschüttelten Enzymassays wurden mit 100 µl Lösungsmittel versetzt, dieses bestand in der Regel aus dem gleichen phosphorsauren (bzw. essigsauren) Methanol/Wassergemisch, wie es für das Laufmittel verwendet wurde. Die Proben wurden auf dem „Vortex“ geschüttelt und vor der Auftragung auf der HPLC 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert, um Schwebstoffe zu sedimentieren. Über eine Probeschleife wurden 20 µl auf die Säule aufgetragen. Proben, die nicht mit Ethylacetat ausgeschüttelt und evaporiert wurden, wurden nach dem Assay auf Eis gekühlt, mit Methanol und Phosphorsäure gemischt, zentrifugiert und anschließend direkt auf die HPLC-Säule injiziert. Während der Messungen wurden die restlichen Proben kühl gehalten.

Um aus der Peakhöhe die spezifische Aktivität des Enzyms berechnen zu können, bedarf es eines Standards. Der Standard ist das erwartete Reaktionsprodukt, welches in einer bekannten Konzentration auf die HPLC aufgetragen wird und dort mit der Retentionszeit die Identität des Peaks andeutet und mit der Peakhöhe eine Möglichkeit bietet, die gesuchte Konzentration der unbekannten Probe zu berechnen.

$$C_p = \frac{A_p \cdot C_{Std}}{A_{Std}}$$

C<sub>p</sub> = Konzentration der Probe in nmol/20 µl

C<sub>Std</sub> = Konzentration des Standards in nmol/20 µl

A<sub>p</sub> = Peakfläche der Probe

A<sub>Std</sub> = Peakfläche des Standards

$$n = y \cdot C_p$$

n = umgesetzte Stoffmenge in nmol

y = Rücklösevolumenfaktor (bei 100 µl Rücklösevolumen und 20 µl Injektionsvolumen ist der Faktor 100/20 = 5)

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{n}{t}$$

Enzymaktivität in nkat = nmol/s

t = Reaktionszeit in s

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{n_{\text{kat}}}{V_E \cdot C_E} \cdot 1000000$$

Spezifische Aktivität in  $\mu\text{kat/kg}$

$V_E$  = Enzymvolumen in  $\mu\text{l}$

$C_E$  = Enzymkonzentration in  $\text{mg/ml}$

1000000 = Umrechnungsfaktor

## D. Methoden der Molekularbiologie

Alle molekularbiologischen Arbeiten erfolgten mit einmal autoklavierten Verbrauchsmaterialien, wo dies möglich war. Proben wurden, falls nicht anders erwähnt, auf Eis gelagert. Für alle Arbeitsschritte, bei denen mit RNA hantiert wurde, wurden zweimal autoklavierte Gegenstände verwendet, zusätzlich wurden Nitrilhandschuhe getragen. Auch bei Arbeiten mit Phenol, Ethidiumbromid und Acrylamid wurde auf das Tragen von Handschuhen geachtet. Die Geldokumentation mit UV-Licht erfolgte unter Verwendung einer UV-Schutzbrille. Die Hantierung mit flüssigem Stickstoff erfolgte ebenfalls unter den vorgegebenen Sicherheitsvorkehrungen.

### 1. Extraktion von RNA aus Pflanzenkulturen

Die Extraktion von RNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Pflanzenmaterial wurde in einem stickstoffgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zerrieben. Der Mörser war zuvor bei 200 °C 2 Stunden erhitzt worden. Vom vermahlenden Material wurden 50 mg in 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen und mit 500  $\mu\text{l}$  Lösung D (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 0,5% Laurylsarcosin) versetzt. Die Proben wurden kurz bei Raumtemperatur inkubiert und mehrmals auf dem „Vortex“ gemischt, bevor 50  $\mu\text{l}$  2 M Natriumacetatlösung pH 4 zugegeben und sanft gemischt wurde. Die Fällung von unerwünschten Zellbestandteilen erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Citratpuffer-gesättigtem Phenol und 100  $\mu\text{l}$  eiskaltem Chloroform. Es folgten intensives Mischen auf dem „Vortex“, 15 Minuten Inkubation auf Eis und 15 Minuten Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C. 400  $\mu\text{l}$  des wässrigen Überstands wurden in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen eiskaltem Isopropanol gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte bei mindestens 20-minütiger Inkubation bei -20 °C. Die Proben wurden nun 10 Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, und das Pellet wurde zweimal mit Ethanol (70% und 100%) gewaschen. Das Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und mit 20  $\mu\text{l}$  Wasser bei 50 °C gelöst. Die RNA-Menge und Reinheit wurden photometrisch gemessen, die Integrität wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch untersucht. Die RNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 2. Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas/Thermo Fisher. 1  $\mu\text{g}$  RNA und 1  $\mu\text{l}$  des oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers wurden mit Wasser auf 12  $\mu\text{l}$  verdünnt, bei 70 °C 5 Minuten denaturiert und auf Eis gekühlt. 4  $\mu\text{l}$  des 5x Reaktionspuffers, 1  $\mu\text{l}$  Ribolock RNase Inhibitor und 2  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix wurden zupipettiert, die Mischung wurde 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, mit 1  $\mu\text{l}$  M-MLV Reverse Transkriptase versetzt und bei 42 °C für eine Stunde inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde für 5 Minuten bei 70 °C denaturiert und die RNA mit 0,75  $\mu\text{l}$  RNase H bei 37 °C 20 Minuten verdaut. Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.



### 3. Extraktion von gDNA

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Rogers und Bendich (Rogers und Bendich 1985): 200 mg der abgenutzten und in flüssigem Stickstoff pulverisierten Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 300 µl 65 °C warmem 2x CTAB (2% w/v CTAB, 100 mM Tris/HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% w/v Polyvinylpyrrolidon) versetzt, 10-30 Minuten bei 65 °C inkubiert und 5-30 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform und Mischen auf dem „Vortex“ wurden die Zellen bei 16000 g 5 Minuten zentrifugiert. Der wässrige Überstand der Extraktion wurde in neue Gefäße mit 30 µl 65 °C warmem 10x CTAB (10% w/v CTAB, 0,7 M NaCl) pipettiert, mit 300 µl Chloroform vermischt und erneut für 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. 250 µl des wässrigen Überstands wurden in neuen Gefäßen mit 250 µl CTAB-Präzipitations-Puffer (1% w/v CTAB, 50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA) gemischt und 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das feine Pellet wurde vorsichtig mit 200 µl High Salt TE (10 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) resuspendiert, mit 400 µl 100% Ethanol p.a. gemischt und bei -20 °C für 15 Minuten gefällt. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 16000 g wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die gDNA wurde mit 20-50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) rückgelöst und verbliebene RNA mit 0,75 µl RNase H für 15-30 Minuten bei 37 °C verdaut. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mittels Photometer gemessen. gDNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

### 4. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Trennung von DNA und RNA wurden Agarosegele als Matrix verwendet. Diese wurden in der Regel in einer 0,7%igen Lösung mit 0,5x TBE (44,5 mM Tris, 44,5 mM Borsäure, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA) bzw. 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA) als Puffer gelöst. Die Proben wurden mit einem 6x Ladepuffer aus 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol in 60% Glycerol und 60 mM EDTA gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Der Größenmarker war der GeneRuler DNA Ladder Mix von Thermo Fisher Scientific mit einem Größenspektrum von 100 bis 10000 bp. Die Gele (~ 50 ml) wurden mit 1 µl 1% Ethidiumbromid versetzt. Das elektrische Feld betrug ~110 V/10 cm. Der Lauf wurde beendet, wenn die untere Bande (Bromphenolblau) 2/3 des Gels erreicht hatte (40-60 Minuten). Die photographische Dokumentation erfolgte entweder unter UV-Licht bei 285 nm oder digital mittels blau-grünem LED-Licht und einem Amberfilter.

### 5. Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern

Die Sequenzen der im Folgenden genannten Primer sind in den Tabellen unter V.F. aufgeführt.

Da die Veröffentlichung der Genomsequenz von *Anthoceros agrestis* erst nach Beendigung der experimentellen Arbeiten für diese Dissertation erfolgt ist (Szövényi et al. 2015), mussten Gene mit Hilfe der PCR (Saiki et al. 1985) identifiziert werden. Dazu wurden anfangs degenerierte Primer verwendet. Diese wurden mit Hilfe von homologen Sequenzen anderer Organismen aus der NCBI-Datenbank im CLC Sequence Viewer Version 7.0.2 (<http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/>) align. Dabei werden DNA-(Volllängen-)Sequenzen vom Zielprotein bioinformatisch verglichen und übereinstimmende Basenfolgen übereinander aufgeführt. So können bei Gebrauch von genügend vielen Sequenzen konservierte Bereiche identifiziert werden. Unter der Annahme, dass das zu amplifizierende Protein auch diese Konservierung beibehalten hat, können darauf aufbauend Primerpaare generiert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an die Sequenz binden. Die Primer stammen von Eurofins Genomics. Die verwendeten Vergleichssequenzen stammen überwiegend von ursprünglichen Landpflanzen (Laub- und Lebermoose, Farne, Schachtelhalme,

Moosfarne), sofern dafür Sequenzen vorlagen. Die Genbanknummer der verwendeten Sequenzen für die degenerierten Primer sind die folgenden:

PAL (Nukleotidsequenzen):

GU456381.1	AY803287.1	AY803283.1	EU071050.1
Y12461.1	AY803281.1	AY803280.1	FN665700.1
L33677.1	AJ002221.1	JQ975419.1	EU650628.1
DQ230992.2	AY803284.1	U16130.1	AY803289.1
NM_001250027.1	JQ277717.1	HM062775.1	AM418586.1
XM_001760443.1	AY803288.1	AY803286.1	

HCT (Nukleotidsequenzen):

FN647681.1	FR670523.1	XM_001780218.1	XM_001779796.1
XM_001763845.1	XM_001755147.1	XM_001752361.1	XM_001762374.1
XM_001767838.1	XM_001768450.1		

TAT (Nukleotidsequenzen):

NM_124776.4	NM_123007.5	NM_128044.2	AJ458993.1
X02741.1	NM_001251479.2	X52520.1	JN863949.1
GU370929.1			

TAT (Proteinsequenzen):

NP_001029762.1	NP_001238408.1	NP_000344.1	AAY85183.1
ADO17550.1	ADC33123.1	XP_001770099.1	ABC60050.1
NP_036800.1	CAD30341.1	ADZ24702.1	

Der Standard-PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Gesamtvolumen 25 µl

1,0 µl cDNA/gDNA

5,0 µl 5x GoTaq Flexi Puffer

0,5 µl 10 mM dNTP Mix

3,0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 µl Primer 1 (10 oder 100 µM)

0,5 µl Primer 2 (10 oder 100 µM)

0,1 µl GoTaq Flexi Polymerase

14,4 µl Wasser

Die Mischung wurde, wenn möglich, als Master Mix auf Eis vorbereitet, bevor sie in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert wurde.

Variationen der PCR sahen eine Verdünnung der gDNA bis zu 1:100 mit Wasser vor, ebenso eine Veränderung der Magnesiumkonzentration zwischen 1 und 4 mM (Endkonzentration), Wahl von 10 bzw. 100 µM Primerkonzentration oder den Zusatz von bis zu 5% DMSO. Die Wahl anderer Polymerasen (DreamTaq, PhusionTaq, HotStart/TrueStart Taq) wurde unter Verwendung des dazugehörigen Puffers angepasst. Erneut wurden Änderungen der Volumina einzelner Komponenten durch Anpassung des Wasservolumens ausgeglichen. Diese Änderungen wurden auch für die übrigen hier vorgestellten PCR-Methoden verwendet, sofern es sich als praktikabel erwies, und werden dort deshalb nicht erneut aufgeführt.

Die Zyklen für die Thermocycler beinhalteten folgende Schritte:

1. Zyklus	94 °C, 120 s	Tm', 60 s	70 °C, 90 s
2.-39. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 60 s	70 °C, 90 s
40. Zyklus	94 °C, 60 s	Tm', 60 s	70 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			

Tm' ist dabei eine Temperatur, bei der ein Anbinden des Primers an die aufgeschmolzene Templatsequenz erwartet wird (Primerhybridisierung, „Annealing“). Üblicherweise wurde die Schmelztemperatur Tm-5 °C als Tm' und ein Gradient von bis zu 10 °C mit Schritten von 2-3 °C darunter bis knapp darüber gewählt. Tm war die berechnete Temperatur der Eurofins-Website. Bei Primern, die genunspezifische Überhänge besaßen, wurde Tm ohne diesen Überhang berechnet. Es wurden auch Touchdown-PCRs durchgeführt. Dabei wird mit einer Temperatur knapp über Tm angefangen und pro Zyklus die Annealing-Temperatur um 0,5 °C gesenkt. Dies wird 30-40 Zyklen wiederholt, anschließend erfolgten weitere 20-30 Zyklen bei einer festen Annealing-Temperatur von 45 °C. Auf diese Weise wurde eine hochspezifische Primer-Sequenz-Bindung und effiziente Amplifizierung erwartet.

Nach dem Lauf wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Produkte in der erwarteten Größe wurden ausgeschnitten und einer Gelextraktion unterzogen.

#### a) CODEHOP PCR

CODEHOP steht für Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (Rose et al. 2003). Es ist eine besondere Strategie der Generierung von PCR-Primern. Konservierte Bereiche eines Proteinsequenzalignments werden computergestützt in einzelne Blöcke unterteilt. Diese Blöcke bestehen aus zwei Bereichen: der „Consensus-Klammer“ am 5'-Ende und dem „degenerierten Kern“ am 3'-Ende. Dabei soll die Consensus-Klammer die Stabilität beim Annealing in der PCR liefern, während der degenerierte Kern durch die Wahl verschiedener Basen („wobbles“) eine hohe Variabilität zulässt, so dass der Primer stringent binden und die Sequenz amplifiziert werden kann.

Mit Hilfe eines CODEHOP Alignments wurden für die TAT Primer generiert. Dafür wurden folgende Sequenzen verwendet:

ABC60050.1	CAD30341.1	NP_001068082.2	NP_001238408.1
XP_003628555.1	NP_200208.1	XP_002523289.1	XP_002276464.1
XP_002275047.1	XP_002276551.1	XP_002517869.1	XP_002517868.1
NP_198465.3	NP_001046626.1	NP_001057579.1	NP_001242401.1
NP_180058.1	CBI21891.3		

#### 6. Gelextraktion über Siliciumdioxidsäulen

Die Gelextraktion wurde mit dem Produkt NucleoSpin Gel and PCR clean-up von Macherey-Nagel durchgeführt. Dafür wurde 200 µl NT-Puffer pro 100 mg Gel unter Schütteln bis zur Verflüssigung auf 50 °C erhitzt. Die Lösung wurde bei 11000 g für eine Minute vollständig durch die Säulen zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde mit 700 µl Puffer NT3 mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Säule durch Zentrifugation bei 11000 g für 2 Minuten. Die Elution erfolgte mit 15-50 µl Wasser und Inkubation für 2-5 Minuten bei Raumtemperatur. Das Eluat wurde durch Zentrifugation in Reaktionsgefäße aufgesammelt. Durch Volumenreduktion in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA-Konzentration erhöht, wenn dies nötig war.

## **7. Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau ist eine wichtige Methode molekularbiologischen Arbeitens. Der Standardverdau wurde in 15-25 µl Volumen durchgeführt. Bei Abweichungen davon wird darauf in den entsprechenden Kapiteln eingegangen, ansonsten wurde das hier beschriebene Pipettierschema verwendet:

Gesamtvolumen 15 µl

x µl Wasser

y µl DNA

1,5 oder 3 µl 10x Puffer (entsprechend 1x oder 2x Puffer Endkonzentration)

0,5-1 µl Restriktionsenzym 1

0-0,5 µl Restriktionsenzym 2 (optional)

Gesamtvolumen 25 µl

x µl Wasser

y µl DNA-Lösung

2,5 oder 5 µl 10x Puffer (entsprechend 1x oder 2x Puffer Endkonzentration)

1,5-2,5 µl Restriktionsenzym 1

0-1,5 µl Restriktionsenzym 2 (optional)

Die Proben wurden für 30 Minuten bis 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Wahl der Puffer-Endkonzentration war abhängig vom verwendeten Enzym bzw. von den verwendeten Enzymen im Doppelverdau. Hierbei wurde angestrebt, maximale Enzymaktivität zu erhalten und unspezifischen Verdau auszuschließen. Die Wahl des Enzyms richtete sich nach den Restriktionsschnittstellen im Gen oder im Vektor.

## **8. Ligation in Vektoren**

Die Ligation ist die kovalente Verknüpfung einer Insert-Sequenz mit einem Vektor. Dieser Vektor ist ein Plasmid, welches über Transformation chemokompetenter Bakterien in diese eingeführt wird. Handelt es sich um einen high-copy Vektor (pDrive, pRACE), wird dieser im Bakterium in hoher Zahl vervielfältigt. Ein Expressionsvektor hingegen wird bei entsprechender Behandlung (Induktion) als Templat zur Transkription und Translation verwendet (pET-15b, pRSET-C). Es wurden hier zwei Formen der Ligation verwendet: die TA-Ligation und die Ligation in überhängende Enden von Restriktionsschnittstellen.

### **a) TA-Ligation**

Die TA-Ligation ist eine einfache Art des Einbaus von Inserts in Vektoren. Sie beruht auf dem Anhang eines Adenins am Ende der PCR-Reaktion der DNA-Polymerase Typ A am fertigen Strang. Dieses Adenin kann mit einem überhängenden Thymin des linearen Plasmids wechselwirken und erleichtert so den Einbau des Inserts in den Vektor. Durch das Fehlen einer Polarität kommt es, statistisch gesehen, bei 50% der Vektoren zu einem reversen Einbau. Die TA-Ligation wurde mit dem PCR cloning kit von Qiagen durchgeführt. Dafür wurden in einem Gesamtvolumen von 5 µl 2,5 µl 2x Ligations-Mix 2 µl Insert und 0,5 µl pDrive cloning vector pipettiert und bei 4 °C über Nacht oder bei 15 °C für mindestens 2 Stunden ligiert. Die Ligation wurde im Anschluss für 10-15 Minuten auf 65 °C erhitzt, abgekühlt und für die Transformation verwendet.

### **b) T4-Ligation**

Die zweite angewandte Form der Ligation ist die Ligation mit T4-DNA-Ligase in die überhängenden Enden von mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen DNA-Stücken. Die Ligase kommt natürlich in dem Bakteriophagen T4 vor. Für die T4-Ligase wird ein mit Restriktionsenzymen verdautes DNA-Fragment in ein ebenfalls mit den gleichen Enzymen verdautes Plasmid eingebracht. Hier kann es zu einem gerichteten Einbau des Inserts kommen, wenn verschiedene Restriktionsendonukleasen für die beiden Schnitte verwendet wurden. Das Verhältnis von Insert zu Plasmid für T4-Ligationen wurde zwischen 3:1 bis 10:1 gewählt, das Insert lag demnach im Überschuss vor. Die einzusetzenden DNA-Mengen wurden über folgende Formel berechnet:

$$\frac{m_V \cdot l_I}{l_V} \cdot r = m_I$$

$m_V$  = Masse an eingesetztem Vektor in ng

$m_I$  = Masse an einzusetzendem Insert in ng

$l_V$  = Länge des Vektors in kb

$l_I$  = Länge des Inserts in kb

$r$  = Verhältnis Insert:Vektor

Das Volumen wurde daraus mit Hilfe der Konzentration berechnet.

Der Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 10 µl

X µl Insert

Y µl Plasmid

Z µl Wasser

1 µl 10x T4 DNA-Ligasepuffer

1 µl T4 DNA-Ligase

1 µl 50% PEG 4000

Die Mischung wurde für 16 bis 72 Stunden bei 4 °C ligiert und die Reaktion bei 65 °C für 10 bis 15 Minuten gestoppt. Die abgekühlte Lösung wurde für die Transformation verwendet.

## **9. RACE PCR**

RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR ist ein Methodenkomplex, mit der Vollständigensequenzen eines Gens sowie untranslatierte Bereiche gefunden werden können. Prinzipiell braucht man einen Adapter, also eine Primersequenz bekannter Basenabfolge, die an das 5'-Ende der Zielsequenz gebunden wird. Das 3'-Ende wird häufig über den PolyA-Schwanz der mRNA generiert.

### **a) Klassische RACE PCR**

Klassische RACE PCR wurde nach einem veränderten Protokoll von Scotto-Lavino et al. durchgeführt (Scotto-Lavino et al. 2007b, 2007a). Hierbei wird der Adapter mit einem oligo(dT)<sub>17</sub> (Q<sub>T</sub>) versehen. Der Adapter selbst ist in zwei Bereiche gegliedert, einen äußeren Bereich Q<sub>O</sub> und einen inneren Bereich Q<sub>I</sub> (siehe Primerliste unter V.F.2.b.).

#### **(1) 3'-RACE PCR**

Die cDNA-Synthesen wurden mit dem RevertAid-Kit von Fermentas durchgeführt. 5 µg RNA wurden mit Wasser auf 11,5 µl verdünnt und bei 70 °C 5 Minuten erhitzt. Die Probe wurde auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend pipettierte man 4 µl 5x Puffer, 0,5 µl 100 µM Q<sub>T</sub>-Primer, 1 µl RNase-Inhibitor und 2 µl 10 mM dNTP-Mix hinzu, inkubierte für 5 Minuten bei 25 °C und gab 1 µl Reverse Transkriptase zu der Mischung. Die cDNA-Synthese wurde eine Stunde bei 42 °C und 10

Minuten bei 50 °C inkubiert. Es erfolgte eine Inaktivierung bei 70 °C für 15 Minuten und ein RNA-Verdau mit 0,75 µl RNase H bei 37 °C in 20 Minuten. Die cDNA wurde mit TE-Puffer oder Wasser 1:5 oder 1:10 verdünnt.

Die PCR-Reaktionen wurden als nested-PCR durchgeführt, das heißt, eine Sequenz wird mit einem Primerpaar amplifiziert und das Produkt in einer zweiten PCR mit innen flankierenden Primern erneut vervielfältigt. Diese Strategie hatte zum Vorteil, dass die Menge bzw. Intensität des PCR-Produkts erhöht wurde und die Spezifität für das gesuchte Gen stieg. Dabei wird Q<sub>0</sub> mit dem genspezifischen Primer 3'GSP1 und Q<sub>i</sub> mit 3'GSP2 kombiniert. Nested-PCRs wurden häufig auch bei den anderen vorgestellten Methoden angewandt.

Erste PCR, Gesamtvolumen 50 µl

5 µl 10x TrueStart Taq Puffer

1 µl 10 mM dNTP

3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl 3'cDNA

2,5 µl Q<sub>0</sub>-Primer (10 oder 100 µM)

2,5 µl 3'GSP1-Primer (10 oder 100 µM)

0,5 µl TrueStart Taq Polymerase

34,5 µl Wasser

PCR-Programm

1. Zyklus	95 °C, 5 min	Tm', 120 s	72 °C, 40 min
2.-30. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 3 min
31. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 15 min
Kühlen bei 6 °C			

Das Produkt wurde optional 1:20 mit TE-Puffer oder Wasser verdünnt.

Zweite PCR, Gesamtvolumen 50 µl

5 µl 10x TrueStart Taq Puffer

1 µl 10 mM dNTP

3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl Produkt der ersten PCR (unverdünnt oder 1:20)

2,5 µl Q<sub>i</sub>-Primer (10 oder 100 µM)

2,5 µl 3'GSP2-Primer (10 oder 100 µM)

0,5 µl TrueStart Taq Polymerase

34,5 µl Wasser

PCR-Programm

Aktivierung	95 °C, 5 min		
1.-29. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 3 min
30. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 15 min
Kühlen bei 6 °C			

Änderungen in der Zusammensetzung der PCR-Komponenten wurden in Punkt V.D.5. erwähnt, zusätzlich wurden hier PCR-Reaktionen mit GoTaq Flexi Polymerase angewandt. Tm' war 53 °C, es wurden jedoch auch Gradienten-PCRs durchgeführt.

## (2) 5'-RACE PCR

Hier wurde die cDNA-Synthese wie bei der 3'-RACE cDNA durchgeführt, allerdings wurde als Primer der genspezifische GPRT Primer verwendet.

5 µg RNA wurden mit Wasser auf 11,5 µl verdünnt und bei 70 °C 5 Minuten erhitzt. Die Probe wurde auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend pipettierte man 4 µl 5x Puffer, 0,5 µl 100 µM GPRT-Primer, 1 µl RNase-Inhibitor und 2 µl 10 mM dNTP-Mix hinzu, inkubierte für 5 Minuten bei 25 °C und gab 1 µl Reverse Transkriptase zu der Mischung. Die cDNA-Synthese wurde eine Stunde bei 42 °C und 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Es erfolgte eine Inaktivierung bei 70 °C für 15 Minuten und ein RNA-Verdau mit 0,75 µl RNase H bei 37 °C in 20 Minuten.

Nach dem RNase-Verdau wurde ein PolyA-Schwanz an das 5'-Ende angefügt. Dafür wurden 15 µl cDNA mit 4 µl 5x Tdt-Puffer, 0,5 µl 2,5 mM dATP und 0,5 µl terminale Desoxynucleotidyltransferase (Tdt) für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und bei 70 °C für 10 Minuten deaktiviert. Die cDNA wurde optional 1:2,5 mit TE-Puffer oder Wasser verdünnt.

Die PCRs wurden erneut als nested-PCR durchgeführt.

Erste PCR, Gesamtvolumen 50 µl

5 µl 10x TrueStart Taq Puffer

1 µl 10 mM dNTP

3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl 5'cDNA

2,5 µl Q<sub>T</sub>-Primer (10 oder 100 µM)

2,5 µl Q<sub>O</sub>-Primer (10 oder 100 µM)

2,5 µl 5'GSP1-Primer (10 oder 100 µM)

0,5 µl TrueStart Taq Polymerase

32 µl Wasser

PCR-Programm

1. Zyklus	95 °C, 5 min	48 °C, 120 s	72 °C, 40 min
2.-30. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 3 min
31. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 15 min
Kühlen bei 6 °C			

Das Produkt wurde optional 1:20 mit TE-Puffer oder Wasser verdünnt.

Zweite PCR, Gesamtvolumen 50 µl

5 µl 10x TrueStart Taq Puffer

1 µl 10 mM dNTP

3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl Produkt der ersten PCR (unverdünnt oder 1:20)

2,5 µl Q<sub>I</sub>-Primer (10 oder 100 µM)

2,5 µl 5'GSP2-Primer (10 oder 100 µM)

0,5 µl TrueStart Taq Polymerase

34,5 µl Wasser

#### PCR-Programm

Aktivierung	95 °C, 5 min		
1.-29. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 3 min
30. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 15 min
Kühlen bei 6 °C			

#### **b) RLM RACE**

Die RLM-RACE (RNA ligase mediated RACE), auch capfinder Methode genannt, wurde mit dem ExactStart™ Eukaryotic mRNA 5'-&3'-RACE Kit von Epicentre durchgeführt (Clepet 2004). Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass fertige mRNA, im Vergleich zu anderen RNA-Spezies, eine Schutzgruppe aus 7-Methylguanosin besitzt, welches über eine 5'-Triphosphatbrücke mit dem 5'-Ende der ersten regulären RNA-Ribose invers verbunden ist. Dieser m<sup>7</sup>G-cap stabilisiert die RNA vor enzymatischem Abbau und wird als Marker verwendet, um Vollängensequenzen bei der cDNA-Synthese zu generieren.

Bevor die cDNA synthetisiert wurde, wurde die RNA in drei Schritten behandelt:

##### 1. Behandlung mit alkalischer Phosphatase zur Entfernung von 5-Phosphatresten ungeschützter RNA

Gesamtvolumen 100 µl

80 µl Wasser

10 µl Apex Reaktionspuffer

5 µl RNA (1-10 µg)

5 µl Apex hitzelabile alkalische Phosphatase

Die Mischung wurde für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Chloroform Extraktion und Fällung der RNA mit Natriumacetat und Isopropanol wie vom Hersteller empfohlen. Dazu wurde 1 µl Glykogenlösung und 100 µl einer 1:1-Mischung aus Citratpuffer-gesättigtem Phenol und Chloroform zur Lösung pipettiert und intensiv gemischt. Nach Zentrifugation bei 10000 g für eine Minute wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die organische Phase wurde mit 100 µl Wasser erneut extrahiert und der wässrige Überstand der zwei Extraktionen vereinigt. 200 µl Chloroform wurden zur RNA-haltigen wässrigen Lösung gegeben. Es folgte ein intensives Mischen und Zentrifugation für eine Minute bei 10000 g. Der wässrige Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 20 µl 3 M Natriumacetatlösung und 100 µl Isopropanol gemischt und auf Eis für 15-30 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen der RNA wurde das Pellet in 7,5 µl Wasser gelöst.

##### 2. Behandlung mit Saurer Pyrophosphatase aus Tabak (Tobacco acid pyrophosphatase, TAP) zur Entfernung des 5'-caps inkl. des Pyrophosphats

Gesamtvolumen 10 µl

1 µl TAP Puffer

0,5 µl RiboGuard RNase Inhibitor

7,5 µl RNA-Probe aus 1

1 µl Saure Pyrophosphatase

Die Mischung wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.



### 3. Ligation des 5'-RACE Akzeptor-Oligomers an die verbliebenen 5'-Phosphatreste der cap-freien RNA

Gesamtvolumen 20 µl

10 µl RNA-Probe aus 2

4 µl Wasser

2 µl RNA-Ligasepuffer

1 µl TAP Stopp Puffer

1 µl 5'-RACE Akzeptor Oligo

1 µl 2 mM ATP

1 µl T4 RNA-Ligase

Die Mischung wurde in dieser Reihenfolge pipettiert und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert.

Es folgte nun die cDNA-Synthese mit einem Oligo(dT) Primer, der eine Kit-spezifische PCR-Primerbindestelle aufwies. Zu den 20 µl ligierter RNA aus 3 wurden 14 µl Wasser, 1 µl cDNA-Synthese-Primer, 2 µl dNTP-Fertigmischung, 2 µl M-MLV Reverse Transkriptase Puffer und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (RT) pipettiert. Die Mischung wurde bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, die RT für 10 Minuten bei 85 °C inaktiviert und die RNA für 5 Minuten bei 55 °C mit 1 µl RNase H verdaut.

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt:

41 µl cDNA

18 µl Wasser

5 µl PCR Primer 1 (Kit)

5 µl PCR Primer 2 (Kit)

30 µl FailSafe PCR Premix E

1 µl GoTaq Flexi Polymerase

PCR Programm

Aktivierung 95 °C, 30 s

1.-20. Zyklus 95 °C, 20 s 60 °C, 20 s 72 °C, 3 min

Kühlen bei 6 °C

Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels Tdt polyadenyliert und mit den Primern nach Scotto-Lavino et al. (Scotto-Lavino et al. 2007a, 2007b) sowie genspezifischen Primern weiter amplifiziert siehe V.D.9.a).

### **c) SMART RACE**

SMART-RACE ist eine weitere wichtige Abwandlung der klassischen RACE. SMART steht dabei für „switching mechanism at 5'-end of RNA transcript“. Die Versuche wurden mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit von Clontech sowie dem Nachfolgeprodukt derselben Firma, SMARTer® RACE 5'/3'-Kit durchgeführt (Chenchik et al. 1998; Bower und Johnston 2010). Das Prinzip beruht darauf, dass die verwendete Reverse Transkriptase am 3'-Ende der cDNA (entspricht dem 5'-Ende der Templat RNA) einen Poly C-Schwanz anfügt, der mit einem G-reichen zweiten Primer wechselwirkt. Dieser zweite Primer enthält eine Adaptersequenz, die von der Reversen Transkriptase weiterhin als Templat für dieselbe cDNA dient (der „switching mechanism“). Somit enthält die fertige cDNA zwei Adapterbereiche, am 3'- und am 5'-Ende, die bei der PCR als Primerbindestelle dienen. Die

genspezifischen Primer des SMARTer® RACE 5'/3'-Kits enthielten zusätzlich eine Adaptersequenz für den Einbau in den pRACE-Vektor der Firma Clontech.

Gemäß Angaben des SMARTer RACE Kit Protokolls wurden 4 µl 5x First-Strand Puffer, 0,5 µl 100 mM DTT und 1 µl 20 mM dNTP Mix in ein Reaktionsgefäß pipettiert (Lösung A). In einem anderen Gefäß wurden 1 µl RNA, 1 µl 5'CDS Primer A und 9 µl Wasser pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde bei 72 °C für 3 Minuten inkubiert, anschließend für 2 Minuten bei 42 °C, schließlich auf Eis abgekühlt. Zu dieser Probe wurde 1 µl SMARTer II A Oligonucleotid gegeben (Lösung B). Lösung A wurde mit 0,5 µl RNase Inhibitor und 2 µl SMARTScribe Reverse Transkriptase gemischt und diese Lösung dann vollständig zu Lösung B pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 90 Minuten bei 42 °C inkubiert und für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die 5'-cDNA wurde mit 90 µl TE-Puffer verdünnt.

Die anschließende PCR hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl

15,5 µl Wasser  
25 µl 2x SeqAmp Puffer  
1 µl SeqAmp DNA Polymerase  
2,5 µl SMARTer RACE cDNA  
5 µl 10X Universal Primer Mix (UPM)  
1 µl 10 µM 5'GSP

PCR Programm

1.-39. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 3 min
40. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	72 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			

Bei Bedarf wurde das PCR-Produkt 1:100 mit Wasser oder TE-Puffer verdünnt und eine Nested-PCR mit dem Nested Universal Primer (NUP) des Kits durchgeführt. Dabei wurde das gleiche Protokoll wie für die erste PCR verwendet, jedoch statt des UPM der NUP und ein zweiter 5'GSP verwendet, der in der Sequenz weiter innen bindet.

#### (1) In-Fusion Klonierung von SMARTer RACE-Produkten

Hierbei handelt es sich nicht um eine Ligation eines PCR-Produkts in einen Vektor, sondern um ein rekombinatives Verfahren. Diese Fusions-Klonierung wurde mit spezifischen Enzymen der Firma Clontech durchgeführt. Es wurde nach Herstellerangaben, jedoch im halben Ansatz, gearbeitet:

Gesamtvolumen 5 µl  
0,5 µl linearisierter pRACE Vektor  
3,5 µl PCR-Produkt mit pRACE-spezifischen Überhängen  
1 µl In-Fusion HD Master Mix

Die Mischung wurde für 15 Minuten bei 50 °C inkubiert und dann auf Eis gekühlt.

### 10. Inverse PCR

Die Inverse PCR (Ochman et al. 1988) ist eine Methode, unbekannte Sequenzabschnitte in gDNA zu identifizieren, die eine bekannte Sequenz umschließen. Sie wurde an einer HCT aus *Anthoceros* angewandt. Dazu werden genspezifische Primerpaare erstellt, die in entgegengesetzte Richtungen

laufen. Wichtig ist, dass zwischen den Primern eine Restriktionsschnittstelle für ein Enzym (B) mit 6 bp Erkennungsmotiv liegt. 1 µg der gDNA wird nun in 15 µl Volumen mit einem Restriktionsenzym (A) mit 4 bp Erkennungsmotiv geschnitten. Dabei wird darauf geachtet, dass das Enzym nicht in der bekannten Sequenz schneidet. Um die Trefferquote zu erhöhen, werden hier verschiedene Ansätze mit mehreren Restriktionsenzymen (EcoRI und HindIII) ausprobiert. Das Enzym wird bei 65 °C (EcoRI) bzw. 80 °C (HindIII) für 20 Minuten deaktiviert. Nun folgt eine Autoligation der Sequenzabschnitte. Dafür werden 50 µl 10x T4-Ligase-Puffer, 10 µl T4-DNA-Ligase und 425 µl Wasser zur gDNA pipettiert. Bei 16 °C ligiert die Probe mindestens 2 Stunden. Die DNA wird mit 50 µl 3 M Natriumacetat und 1100 µl 100% Ethanol p.a. für eine Stunde bei -20 °C gefällt und für 20 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die in 8 µl rückgelöste DNA wurde mit 1 µl Enzym B (BstEII) und 1 µl 10x Puffer über Nacht geschnitten und das Produkt mit den Primerpaaren in einer regulären PCR amplifiziert.

#### PCR-Programm

1. Zyklus	94 °C, 120 s	62 °C, 60 s	70 °C, 5 min
2.-39. Zyklus	94 °C, 30 s	62 °C, 60 s	70 °C, 5 min
40. Zyklus	94 °C, 60 s	62 °C, 60 s	70 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			
Es wurde kein Gradient gewählt.			

Nach einem ähnlichen Prinzip funktioniert das 5'-Full RACE Core Set der Firma TaKaRa (Maruyama et al. 1995). Dabei wird ein genspezifischer 5'-phosphorylierter Primer für die Synthese der cDNA verwendet. 5 µg RNA, 3 µl 5x RT-Puffer, 0,5 µl RNase Inhibitor, 1 µl Reverse Transkriptase, 1 µl 5'-P-RT-Primer und 2 µl 10 mM dNTP wurden gemischt und mit Wasser auf 15 µl aufgefüllt. In einem Heizblock wurde die Inkubation nach folgendem Protokoll durchgeführt:

30 °C – 10 Minuten  
 50 °C – 30-60 Minuten  
 80 °C – 2 Minuten  
 Abkühlen auf Eis

Die RNA wurde mit 1 µl RNase H bei 30 °C 1 Stunde verdaut. Es folgte eine Fällung mit 2 µl 2 M Natriumacetat und 40 µl 100% Ethanol für 3 Stunden bei -20 °C. Die DNA wurde bei 4 °C und 12000 g 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde abpipettiert und die DNA getrocknet. Mit 33,3 µl 24% PEG 6000, 4 µl 10x T4 RNA Ligationspuffer und 2,7 µl Wasser wurde die DNA rückgelöst und nach Zugabe von 1 µl T4 RNA Ligase über Nacht bei 15 °C inkubiert. Dabei sollte sich bei entsprechender Verdünnung die DNA in einer Autoligation circular schließen. Die T4 RNA-Ligase kann dabei das 5'-phosphorylierte Ende der Sequenz erkennen und mit dem 3'-Ende der eigenen Sequenz (oder einer anderen Sequenz) ligieren. Die anschließende PCR fand mit den Primern der inversen PCR statt. Die gegenläufigen Primer amplifizieren dabei die unbekannte Sequenz am 5'-Ende des Gens.

### 11. RAGE-PCR

Ausgehend von der klassischen RACE-Methode nach Scotto-Lavino et.al (Scotto-Lavino et al. 2007a, 2007b) wurde eine neue Methode entwickelt, mit der die fehleranfällige Extraktion von RNA und cDNA Synthese umgangen werden kann. Da sie auf gDNA basiert, kann sie deshalb analog zur RACE-PCR als RAGE-PCR bezeichnet werden (rapid amplification of gDNA ends)

1 µg gDNA werden mit blunt-end schneidenden Restriktionsenzymen verdaut. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die bekannte Sequenz im Zielgen nicht geschnitten wird. Um die Wahrscheinlichkeit, ein korrektes Produkt zu erhalten, zu erhöhen, wurden mehrere Restriktionsenzyme in verschiedenen Ansätzen verwendet (SmaI, EcoRV und DraI). Die Ansätze wurden in einem Volumen von 15 µl über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 65 °C deaktiviert. Es folgte eine Polyadenylierung mit Tdt für 5 min (siehe V.D.9.a)(2)). Das Produkt wurde mit genspezifischen Primern und den oben beschriebenen Q-Primern in Nested-PCR amplifiziert.

## 12. Southern Blot und Kolonie Hybridisierung

Die Methode der Hybridisierung von Makromolekülen fand ihren Anfang in den Arbeiten von Southern (Southern 1975), nach dem die Fixierung elektrophoretisch getrennter DNA auf einem Trägermaterial und die anschließende Hybridisierung mit DNA-Sonden benannt wurde.

Für die Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde wurde eine PCR mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche durchgeführt.

Gesamtvolumen 50 µl

1 µl cDNA

5 µl 10x PCR Puffer

5 µl DIG Probe Mix

5 µl 10 µM forward Primer (GSP)

5 µl 10 µM reverse Primer (GSP)

0,75 µl Enzymmix

28,2 µl Wasser

PCR-Programm

1. Zyklus	94 °C, 120 s	Tm', 60 s	70 °C, 2 min
2.-32. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 60 s	70 °C, 2 min
33. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 120 s	70 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			

Es wurde kein Gradient gewählt. Die Sonden wurden vor der Verwendung auf 95 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu auflösen, dann bei 4 °C gelagert.

Für den DNA-Transfer („Blotting“) wurden 35-100 µg gDNA in einem Volumen von 100 µl mit 10 µl 10x Puffer und 10 µl Restriktionsenzym (KpnI bzw. XbaI) über Nacht bei 37 °C verdaut. Erneut wurden verschiedene Restriktionsenzyme in separaten Ansätzen verwendet, um die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Schnittes zu erhöhen. Am nächsten Morgen wurde 1 µl Restriktionsenzym zu der Mischung pipettiert und eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte eine Fällung mit 10 µl 3 M Natriumacetat und 100 µl Isopropanol bei -20 °C für 20 Minuten. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 16000 g wurde das Pellet zweimal mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nun in 30 µl TE-Puffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert. Die Proben wurden auf zwei Geltaschen aufgeteilt und mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf mit einem fluorisierenden Lineal dokumentiert und zwischen den geteilten Proben halbiert. Während eine Hälfte eingefroren wurde, wurde mit der zweiten Hälfte das Blotting durchgeführt. Dafür wurde das Gel 20 Minuten in 0,25 M Salzsäure depuriniert, anschließend zweimal für 20 Minuten in 0,5 M Natronlauge denaturiert. Es folgte ein zweimaliges Neutralisieren für 20 Minuten mit einer Lösung aus 0,1 M Tris/HCl und 1,5 M NaCl.

In eine Wanne wurde 10x SSC gegeben (1,5 M NaCl, 0,15 M Natriumcitrat pH 7,0). Darauf wurde auf einem Podest eine Brücke aus Filterpapier gefaltet. Das Filterpapier tauchte in den SSC-Puffer. Das Gel befand sich auf dem Filterpapier mit der Taschenöffnung nach unten. Darauf wurden die Nylonmembran, vier Lagen mit Filterpapier (zwei davon schon mit Puffer angefeuchtet), ein Stapel Papiertücher und ein Gewicht gestapelt. Die Ränder des Gels wurden mit Plastikfolie abgedeckt, damit kein Kapillarsog am Gel vorbei stattfinden konnte. Sämtliche Membranen und Blätter wurden auf die Größe des Gels geschnitten. Dieser Aufbau wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Am nächsten Morgen wurde die Apparatur abgebaut und die Orientierung des Gels mit Bleistift auf der Nylonmembran markiert. 2 µl der Sonde werden auf die Membran als Positivkontrolle aufgetragen. Diese wurde nach dem Trocknen für 2-3 Stunden bei 80 °C erhitzt, um die DNA zu fixieren.

Die folgenden Arbeiten wurden unter leichtem Schütteln im Wasserbad nach einem modifizierten Protokoll von Engler-Blum (Engler-Blum et al. 1993) durchgeführt. Es folgte eine Prähybridisierung der Membran bei 68 °C im Prähybridisierungspuffer (0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, 1 mM EDTA, 20% SDS 0,5% Blocking Reagenz) für eine Stunde, anschließend eine Hybridisierung über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungspuffer. Dafür wurden 10 µl der DIG-Sonde zu 50 ml frischem warmem Prähybridisierungspuffer gegeben. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 20 Minuten bei 65 °C in Waschpuffer (0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,001 M EDTA, 1% SDS) gewaschen, Diese Stringenzwaschschritte wurden in Temperatur, Dauer und Häufigkeit variiert.

Vor der Detektion der Chemilumineszenz auf Röntgenfilm wurde die Membran 5 Minuten mit dem Detektionswaschpuffer (3 M NaCl, 0,1 M Maleinsäure, pH 8,0, 0,3% Tween 20) und eine Stunde mit dem Blockingpuffer (Detektionswaschpuffer mit 0,5% Blocking Reagenz) äquilibriert. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten mit der Antikörper-Lösung (Blockingpuffer mit 1:10000 Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fraktion) und viermaliges Waschen für 10 Minuten mit dem Detektionswaschpuffer. Schließlich wurde die Nylonmembran 5 Minuten im Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) und 2 Minuten im Substratpuffer (Detektionspuffer mit 1:100 CSPD) geschwenkt und knitter- und blasenfrei in Saran-Folie eingewickelt. Ein Röntgenfilm wurde in der Dunkelkammer mit der Membran in die Expositionskassette gelegt und bei 37 °C für 1-4 Stunden inkubiert. Der Film wurde in der Dunkelkammer entwickelt. Dazu wurde er zuerst in ein Entwicklerbad für 2-3 Minuten getaucht, kurz in Wasser gereinigt, für 2 Minuten in das Fixierbad getaucht und wieder mit Wasser gespült (Entwickler und Fixierer: GBX developer and replenisher bzw. GBX fixer and replenisher von Kodak®).

Bei erfolgreicher Detektion der Sonde auf der verdauten gDNA wird die entsprechende Stelle in der zweiten eingefrorenen Gelhälfte ausgeschnitten und mittels Gelextraktion aufgereinigt. Die DNA-Fragmente werden in den Vektor pGEM-4Z ligiert und chemokompetente *E. coli* EZ damit transformiert. Die Bakterien werden auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien auf sterile Nylonmembran gestempelt, lysiert und die freiwerdenden Plasmide fixiert. Diese Membran wird nun wie oben beschrieben geblottet und mit den Gensonden auf das Vorhandensein des korrekten gesuchten DNA-Abschnitts detektiert. Die entsprechende Bakterienkolonie wird über Nacht kultiviert, das Plasmid daraus extrahiert und sequenziert.

### **13. gDNA- und Kolonie-PCR**

Diese Strategie ist eine Abwandlung der oben beschriebenen Methode: Die Detektion findet nicht mittels Southern Blot statt, sondern über PCR. Erneut werden 70 µg gDNA in 100 µl Gesamtvolumen

mit 10 µl Restriktionsenzymen (EcoRI, KpnI und XbaI) in drei getrennten Ansätzen über Nacht verdaut, gefällt, in 12 µl rückgelöst und die Probe gelelektrophoretisch getrennt. Die Proben wurden nicht in zwei Teile aufgeteilt, sondern der gesamte Verdau wurde in eine Tasche aufgetragen. Da nur Fragmente über 1100 bp interessant waren, wurden der Bereich zwischen der Geltasche und der entsprechenden Größe (etwa 4 cm) in 8 Teile mit je 0,5 cm Breite geschnitten. Jedes Gelstück wurde mittels Siliciumdioxidsäule aufgereinigt und als Templat für eine Touchdown PCR mit genspezifischen Primern verwendet.

Gesamtvolumen 25 µl

1,0 µl gDNA

5,0 µl 5x GoTaq Flexi Puffer

0,5 µl 10 mM dNTP Mix

3,0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 µl 100 µM Primer 1

0,5 µl 100 µM Primer 2

0,1 µl GoTaq Flexi Polymerase

14,4 µl Wasser

Die Zyklen für die Thermocycler beinhalteten folgende Schritte:

Aktivierung	94 °C, 120 s		
1.-39. Zyklus	95 °C, 30 s	59 °C, 60 s <sup>1</sup>	72 °C, 30 s
40.-70. Zyklus	95 °C, 30 s	45 °C, 30 s	72 °C, 30 s
Finale Elongation			72 °C, 20 min
Kühlen bei 6 °C			

<sup>1</sup> Senkung der Temperatur um 0,5 °C/Zyklus

Die Produkte der PCR wurden gelelektrophoretisch untersucht. Die Genfraktion mit dem korrekten Produkt wurde in den pGEM-4Z-Vektor ligiert und chemokompetente *E. coli* EZ damit transformiert. Dafür wurde ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 gewählt. Das entspricht bei Einsatz von 50 ng pGEM-4Z Vektor (2,7 kb) für ein 3 kb große Insert vom KpnI-Verdau 131,8 ng und für das 5 kb große Insert vom XbaI-Verdau 206,5 ng.

Die Mischung wurde in einem Volumen von 10 µl mit T4-DNA-Ligase über Nacht bei 4 °C ligiert, auf 65 °C erhitzt und in *E. coli* EZ eingeführt.

Die ausplattierten Zellen wurden mit Hilfe von sterilen Zahnstochern gepickt und jede Kolonie in PCR-Reaktionsgefäße mit einem Standardmastermix für die PCR mit genspezifischen Primern resuspendiert.

1. Zyklus	94 °C, 3 min	Tm', 60 s	70 °C, 90 s
2.-39. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 60 s	70 °C, 90 s
40. Zyklus	94 °C, 60 s	Tm', 60 s	70 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			

Das Ergebnis der Kolonie-PCR wurde elektrophoretisch untersucht und dokumentiert.

#### 14. PCR mit Volllängenprimern

Nach erfolgreicher Generierung der vollständigen codierenden Sequenz durch Assemblierung des 5'- und des 3'-Endes wurden Volllängenprimer für Expressionsversuche in *E. coli* erstellt. Für die HCTs aus *Anthoceros* wurde der Vektor pET-15b gewählt, für die HCTs aus *Physcomitrella* und die PAL aus *Anthoceros* wurde der Vektor pRSET-C verwendet. Die Primer für *Anthoceros* HCT erhielten

Restriktionsschnittstellen für NdeI und XhoI, HCT 1 und 4 aus *Physcomitrella* die Schnittstellen PvuII und HindII, HCT 2, 3 und 5 aus *Physcomitrella* XhoI und EcoRI, die PAL aus *Anthoceros* erhielt die Schnittstellen BglII und NcoI. Die vollständige Primerliste findet sich unter Punkt V.F.

Die PCR wurde mit einer Polymerase durchgeführt, die eine Proofreading-Aktivität besitzt, um eine hohe Genauigkeit der Replikation zu erhalten. Verwendet wurden zwei verschiedene Enzyme:

Phusion® High Fidelity DNA Polymerase, 25 µl Ansatz

15,25 µl Wasser

5 µl 5x HF-Puffer

0,5 µl 10 mM dNTP-Mix

1,25 µl 10 mM Primer f

1,25 µl 10 mM Primer r

1,5 µl cDNA

0,25 µl Phusion Polymerase

Initiale Aktivierung	98 °C, 90 s		
1.-39. Zyklus	98 °C, 10 s	Tm', 30 s	68 °C, 30 s/kb
40. Zyklus	98 °C, 10 s	Tm', 30 s	68 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			

High Fidelity PCR Enzyme Mix, 50 µl Ansatz

35,25 µl Wasser

5 µl 10x Hifi-Puffer

5 µl 2mM dNTP-Mix

1,5 µl 10 mM Primer f

1,5 µl 10 mM Primer r

1,5 µl cDNA

0,25 µl Hifi Polymerase

Initiale Aktivierung	94 °C, 120 s		
1.-39. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 60 s	72 °C, 90 s
40. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 60 s	72 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			

Die PCR-Produkte wurden mit Agarosegelen elektrophoretisch untersucht. Korrekte Produkte wurden ausgeschnitten, in pDrive ligiert und für Transformationen von *E. coli* verwendet.

## 15. Fusions-PCR

Die Fusions-PCR wurde nach einem Protokoll von Bryskin und Matsumura (Bryskin und Matsumura 2010) durchgeführt. Dabei wird ein Gen amplifiziert, dieses wird dann als Megaprimer in einer zweiten PCR verwendet, wobei es in den Vektor (pET-15b) hineinkopiert wird.

### Erste PCR – Erstellung des Megaprimers

Gesamtvolumen 25 µl

5 µl 5x HF- bzw. GC-Puffer

0,5 µl 10 mM dNTP-Mix

1,25 µl 10 mM Primer f

1,25 µl 10 mM Primer r  
 0,25 µl Phusion Polymerase  
 1,5 µl cDNA  
 15,25 µl Wasser

Initiale Aktivierung	98 °C, 90 s		
1.-39. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	68 °C, 90 s/kb
40. Zyklus	94 °C, 30 s	Tm', 30 s	68 °C, 10 min
Kühlen bei 6 °C			

Das PCR-Produkt wurde über Siliciumdioxidsäulen aufgereinigt.

Für die zweite PCR wurde ein Verhältnis Megaprimmer (Insert):Templat (Vektor) von 250:1 gebraucht. Die Vektormenge kann in einem Bereich von 3-30 ng vorliegen. Da die Ausbeute aus der ersten PCR gering war, wurde eine entsprechend geringe Vektormenge von 6 ng eingesetzt. AaHCT1 und AaPAL lagen zu je 28 ng/µl vor, AaHCT2 zu 162,9 ng/µl.

#### Zweite PCR – Erstellung des Fusionsprodukts

Gesamtvolumen 25 µl  
 5 µl 5x HF- bzw. GC-Puffer  
 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix  
 0,25 µl Phusion Polymerase  
 2 µl 3 ng/µl Vektor  
 X µl Megaprimmer (im 250fachen Überschuss zu Vektor)  
 Y µl Wasser

Initiale Aktivierung	98 °C, 90 s		
1.-39. Zyklus	98 °C, 30 s	Tm', 30 s	70 °C, 90 s/kb
40. Zyklus	98 °C, 30 s	Tm', 30 s	68 °C, 20 min
Kühlen bei 6 °C			

Die zweite PCR wurde auch mit dem Zusatz von je 1 µl 10 mM Primer f und r wiederholt.

### **16. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR wurde mit den Proben des Kulturverlaufs mit *Anthoceros* Zellen in CB-M Medium durchgeführt. Es wurden die Gene für PAL 2, HCT 1, 2 und 5 sowie die als konstitutiv exprimiert angenommen Gene Aktin und Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) untersucht. RNA der Zellen wurden, wie unter V.D.1. beschrieben, extrahiert, quantifiziert und elektrophoretisch analysiert. Für die cDNA Synthese wurde je 0,5 µg RNA pro Tag eingesetzt. Die Arbeiten wurden mit dem qScript™ cDNA SuperMix-Kit von Quanta durchgeführt.

Gesamtvolumen 20 µl  
 4 µl qScript cDNA SuperMix (5x)  
 X µl RNA (0,5 µg)  
 Y µl Wasser



Die Proben wurden für 5 Minuten auf 25 °C, für 30 Minuten auf 42 °C und für 5 Minuten auf 85 °C erhitzt und dann auf 4 °C abgekühlt. Die cDNA wurde 1:5 mit 80 µl TE-Puffer verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Die PCR wurde in dreifachen technischen Replikaten mit dem PerfeCta® SYBR® Green SuperMix von Quanta durchgeführt. Zur Qualitätssicherung wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA erstellt. Dazu wurden aus den cDNA Proben von jedem Tag 10 µl entnommen und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Von diesen 150 µl wurden 40 µl 1:4 mit 120 µl Wasser verdünnt. Die Probe wurde gut gemischt und 40 µl davon erneut 1:4 mit 120 µl Wasser verdünnt. Diese Verdünnungsschritte wurden insgesamt dreimal durchgeführt, so dass am Ende vier Verdünnungsstufen vorlagen. Mit diesen Proben wurden ebenfalls dreifache Wiederholungen pro Gen durchgeführt. Mit Hilfe von PCRs auf RNA-Templat wurde die Qualität und Reinheit der RNA-Extraktion untersucht. Als Negativkontrolle dienten Wasserproben als Templat. Außer für PAL 1 wurden die Primer mit dem qPCR Primer & Probe Design Tool von Eurofins erstellt, PAL 1 Primer wurden mit dem Programm Primer3 von SimGene erstellt.

Die PCR mit einem Gesamtvolumen von 12,5 µl wurde – soweit möglich – als Mastermix angesetzt und dann in die 96-Well-Platten pipettiert.

6,25 µl 2x PerfeCta SYBR Green SuperMix  
 0,25 µl 10 mM forward Primer  
 0,25 µl 10 mM reverse Primer  
 0,75 µl Wasser

---

7,5 µl Mastermix  
 5 µl cDNA oder cDNA-Verdünnung oder RNA

PCR-Programm für den PikoReal 96 qRT-PCR Cyclyer

Initiale Aktivierung	95 °C, 120 s		
1.-50. Zyklus	95 °C, 15 s	54 °C, 45 s	68 °C, 60 s
Schmelzkurve	50-95 °C		
Kühlen bei 6 °C			

## 17. Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Phylogenetische Analysen wurden mit Proteinsequenzen von PAL und HCTs mit der Software MEGA6 durchgeführt (Kumar et al. 2012; Tamura et al. 2013). Dazu wurden 31 PALs aus Pflanzen mit einer PAL aus der Cyanobakterie *Nostoc punctiforme* als Außengruppe sowie 57 HCTs aus Pflanzen und einer Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) aus *E. coli* als Außengruppe in einem Sequenzvergleich untersucht. Das Alignment wurde mit dem Blossum Algorithmus durchgeführt und danach manuell optimiert, der phylogenetische Baum wurde mit der Maximum-Likelihood-Methode berechnet.

Verwendete Sequenzen für den phylogenetischen Stammbaum der HCT

WP_012477888.1	NP_179497.1	NP_199704.1	CAT00082.1	BAC78633.1
ABO40491.1	NP_001295843.1	ACF37072.1	AFL93686.1	AFN85668.1
AEA36976.1	AFZ78609.1	GOLD36.1	CAE46932.1	XP_009615699.1
CCC55431.1	ACA64049.1	XP_002991534.1	XP_002979061.1	CAE46933.1
AOPDV5.1	CBI83579.1	AFD64619.1	BAO20883.1	AEM63675.1

AEM63676.1	AFF19203.1	XP_002512739.1	AEK80405.1	AIG20957.1
AHA44839.1	KF749428.1	BAA87043.1	ABO77957.1	ABO47805.1
AGA20364.1	AFF57839.1	AFF57840.1	NP_001289240.1	AFK10218.1
Pp1s150_128V6.1	Pp1s15_356V6.1	Pp1s15_356V6.2	Pp1s164_113V6.1	Pp1s16_277V6.1
Pp1s22_138V6.1	Pp1s266_39V6.3	Pp1s275_68V6.3	Pp1s465_28V6.1	Pp1s54_248V6.1
Pp1s64_37V6.1	Pp1s97_287V6.1	HG423392.1	HG423394.1	Mo HST
AaHCT1	AaHCT2	AaHCT5		

Verwendete Sequenzen für den phylogenetischen Stammbaum der PAL

XP_001759216.1	XP_001785664.1	AIU99853.1	AAW80637.1	AAW80636.1
AAW80638.1	AAW80643.1	AAW80640.1	AAW80639.1	ABU49842.1
AHA44840.1	BAG74772.1	AAT66434.1	P45727.1	ADO24189.1
Q8VXG7.1	AFY17067.1	ACX47015.1	CAA34226.1	ACZ44833.1
XP_008805217.1	M84466.1	CBJ23826.1	O23924.1	O04058.2
BAC56977.1	NP_001295839.1	AEJ88223.1	AAC18871.1	P27991.1
WP_012408693.1	AaPAL			

## E. Methoden der Gentechnologie

Sämtliche Arbeiten mit Bakterien wurden, sofern möglich, auf Eis durchgeführt. Sämtliche flüssigen und festen Abfälle wurden gesondert gesammelt und bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten im Autoklaven hitzesterilisiert. Arbeitsflächen und Geräte, die mit Bakteriensuspensionen in Kontakt kamen, wurden mit 70% Ethanol gereinigt. Gentechnisch veränderte Bakterien in Dauerkulturen wurden dokumentiert.

### 1. Medien

#### a) Festes und flüssiges LB-Medium

Das Standardmedium der Kultivierung von Bakterien ist LB:

10 g/l Trypton/Pepton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l NaCl

Die Lösung wurde mit Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Festes Medium enthielt zusätzlich 1% w/v Agar-Agar.

#### b) Flüssiges TB-Medium

TB-Medium wurde für einige Expressionsversuche verwendet:

12 g Trypton/Pepton, 24 g Hefeextrakt und 4 ml Glycerol werden in 900 ml Wasser gelöst, autoklaviert und abkühlen gelassen. Zu der Lösung werden 100 ml sterile 10x TB-Phosphat-Lösung (0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) gegeben.

#### c) SOC-Medium

Das SOC-Medium wurde zur Regenerierung von Bakterien nach dem Hitzeschock verwendet:

20 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl und 2,5 ml 1 M KCl werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH wird auf 7,0 mit 10 M Natronlauge eingestellt und das Volumen auf 990 ml aufgefüllt. Die

Lösung wird autoklaviert und abkühlen gelassen. Dazu werden sterile Lösungen von  $\text{MgCl}_2$  (10 ml, 1 M) und Glucose (20 ml, 1 M) gegeben (Endvolumen 1020 ml)

## **2. Erstellung von chemokompetenten *E. coli*-Kulturen**

Für die gentechnischen Arbeiten wurden Sicherheitsstämme von *E. coli* verwendet: EZ von Qiagen, SoluBL21™ von amsbio und Stellar von Clontech. Für gentechnische Arbeiten wurden die Stämme EZ und SoluBL21 im Labor vermehrt und kompetent gemacht. EZ Zellen dienten dabei der Vermehrung der Vektoren und SoluBL21 der Expression von Proteinen.

In einem Reagenzglas mit 2 ml flüssigem LB-Medium mit 2 µl Tetracyclin (12,5 mg/ml Tet in Ethanol p.a.) werden Zellen der alten Charge mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers angeimpft. Die Reagenzgläser werden mit einem Deckel locker verschlossen und über Nacht bei 37 °C und 220 UpM geschüttelt (ÜN-Kultur). Am nächsten Morgen werden aus einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit ~90 ml sterilem LB + 90 µl Tetracyclin 0,75 ml LB für den Referenzwert der optischen Dichte bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) entnommen. In den Erlenmeyerkolben werden dann 2 ml der ÜN-Kultur gegeben und bei 37 °C und 220 Upm kultiviert, bis eine optische Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,6 erreicht ist. Wenn die benötigte OD erreicht wurde, werden die Suspensionen in zwei sterilen 50 ml Röhrchen 10 Minuten bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml kalter 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Die Suspensionen werden vereinigt und für 12 Minuten bei 4 °C und 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 10 ml kalter 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Die Lösung wird 20 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (12 Minuten, 4 °C, 2500 g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 2 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  mit 15% Glycerol resuspendiert. Die Bakterien wurden zu 150 µl in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff vorgefroren und bei -80 °C gelagert.

## **3. Hitzeschock-Transformation von *E. coli* und Ausplattieren auf LB-Agarplatten**

Die kompetenten Zellen wurden kurz vor der Verwendung auf Eis aufgetaut. 70 µl der Bakteriensuspension wurden in die Reaktionsgefäße mit dem Vektor pipettiert und auf Eis 10-15 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden in einem Wasserbad für 30-60 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Danach erfolgte ein Abkühlen für 1-3 Minuten auf Eis. Zu den Zellen wurden 150 µl 37 °C warmes SOC-Medium gegeben. Die Zellen wurden im Heizblock bei 37 °C und 750 UpM für 30 Minuten regeneriert. Anschließend erfolgte Ausplattieren auf 37 °C warmen LB-Agarplatten. Diese enthielten pro 100 ml Medium 500 µl Ampicillin (20 mg/ml in Wasser, sterilfiltriert), 160 µl X-Gal (50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galaktosid in Dimethylformamid) und 50 µl IPTG (0,1 M Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid in Wasser, sterilfiltriert). X-Gal und IPTG wurden weggelassen, wenn das *lacZ*-Gen im Vektor fehlte und somit keine Blau-Weiß-Selektion möglich war. Die Zellen wurden mit einem hitzesterilisierten Drigalskispatel auf dem Medium verteilt und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

### **a) Transformation von Stellar Zellen**

Die Hitzeschocktransformation der Stellar-Zellen von Clontech wurde weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt:

Die Zellen wurden kurz vor Verwendung auf Eis aufgetaut. 50 µl Zellen wurden zu 5 µl Plasmid gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 45 Sekunden bei 42 °C angewandt. Nach 1-2 Minuten wurden 450 µl 37 °C warmes SOC zu den Zellen gegeben und diese für

eine Stunde bei 300 UpM und 37 °C regeneriert. 10 µl Bakteriensuspension wurden mit 90 µl SOC verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, und am nächsten Tag wurden Übernachtskulturen angelegt.

#### **4. Anlegen von Übernachtskulturen und Glyceroldauerkulturen**

Die angewachsenen *E. coli* Klone wurden in Übernachtskulturen vermehrt. Dazu wurden 20 µl Ampicillin (20 mg/ml in Wasser, steriltfiltriert) in 4 ml LB in Reagenzgläsern gemischt. Mit Hilfe von sterilen Zahnstochern wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in ein Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden bei 37 °C und 220 UpM über Nacht kultiviert. Von diesen Kulturen wurden bei Bedarf Glyceroldauerkulturen angelegt. Dazu wurden 75 µl steriles Glycerol in sterile Reaktionsgefäße gegeben. Dazu kamen 425 µl der Bakteriensuspension. Die Zellen wurden gut vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **5. Plasmidpräparation**

Mit Hilfe der Plasmidpräparation wurden Plasmide aus Bakterien extrahiert. Diese wurden dann entweder sequenziert, oder das Insert wurde herausgeschnitten, um in einen anderen Vektor ligiert zu werden. Auch konnten mit der Plasmidpräparation leere Vektoren gewonnen werden.

3 ml der Bakteriensuspension der Übernachtskulturen wurden in zwei Schritten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 3000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils vollständig verworfen. Die Zellen wurden mit 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert, mit 250 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) lysiert und mit 350 µl Puffer N3 (4,2 M Guanidin-HCl, 0,9 M Kaliumacetat, pH 4, 8) neutralisiert. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Siliciumdioxidröhrchen für Plasmidpräparationen von Qiagen dekantiert und das Pellet verworfen. Die Röhrchen wurden für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert, und der Durchlauf wurde verworfen. 500 µl Puffer PB (5 M Guanidin-HCl, 30% Isopropanol) und 750 µl PE (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 80% Ethanol) wurden nacheinander durch die Säule für 30 Sekunden und 11000 g zentrifugiert. Die Säulen wurden für 1-2 Minuten trocken zentrifugiert (11000 g) und 50 µl Wasser auf das Säulenmaterial pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2-5 Minuten. Das Plasmid wurde in saubere Reaktionsgefäße zentrifugiert. Die Säulen wurden mit 500 µl Wasser zentrifugiert und gereinigt. Die Vektoren wurden einem Restriktionsverdau in einem Volumen von 15 µl mit 3 µl Plasmid unterzogen und das Produkt gelelektrophoretisch untersucht. Für die Sequenzierung wurden 20 µl in neue Reaktionsgefäße gegeben und an Eurofins Genomics bzw. auf eine Konzentration von 80 ng/µl mit einem Gesamtvolumen von 12 µl eingestellt und zur Sequenzierung an SeqLab geschickt. Von Kolonien mit korrekten Sequenzen wurden Glyceroldauerkulturen angelegt. Vollständigsequenzen wurden für Umklonierungen in Expressionsvektoren verwendet.

#### **6. Umklonierung in Expressionsprimer**

Das Umklonieren fand in der Regel als Doppelverdau statt, da die Sequenz mit einer korrekten Polarität in den Vektor eingebaut werden musste. Dafür wurden folgende Komponenten gemischt und bei 37 °C über Nacht verdaut.

Gesamtvolumen 15 µl

y µl DNA-Lösung

1,5 oder 3 µl 10x Puffer (entsprechend 1x oder 2x Puffer Endkonzentration)

0,5-1 µl Restriktionsenzym 1

Die DNA wurde in mehreren Ansätzen verdaut, um genügend Insert extrahieren zu können. Die Proben wurden elektrophoretisch getrennt, und das Insert mittels Siliciumdioxid-Säulen gereinigt. Die Inserts wurden in einem Verhältnis von 3:1-10:1 in das Plasmid mit T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 10 µl ligiert und zuerst in den Stamm *E. coli* EZ und dann nach Validierung der erfolgreichen Umklonierung in den Expressionsstamm SoluBL21 eingebracht. Dabei wurden erneut Hitzeschocktransformationen durchgeführt und Übernachtskulturen angelegt.

## 7. Synthese heterologer Proteine

Expressionsvektoren, die das Gen in korrekter Polarität tragen und mit denen *E. coli* SoluBL21 transformiert wurden, wurden verwendet, um heterolog Proteine zu synthetisieren. Dazu wurden 2 ml LB mit 10 µl Ampicillin (20 mg/ml) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 UpM inkubiert. Am nächsten Tag wurde von 100 ml flüssigem LB-Medium 0,75 ml Probe für die photometrische Referenz entnommen. Zum restlichen LB wurde die Übernachtskultur gegeben und bei 37 °C und 220 UpM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit 100 µl 1 M IPTG (Endkonzentration 1 mM). Abweichend davon wurde auch 0,1 mM Endkonzentration ausprobiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 25 °C kultiviert. Bei Verwendung von TB-Medium wurde nach der Induktion bei 37 °C für 4-5 Stunden kultiviert. Die Ernte der Zellen und die Proteinextraktion und -reinigung erfolgte wie in Punkt V.C.4. beschrieben.

## F. Primerliste

### 1. Primer für *Anthoceros agrestis*

#### a) Genexpressionsprimer/qRT PCR Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> Sequenz [°C]	<b>Schnitt-</b> <b>stelle</b>	Bemerkung
qHCT1-f	<u>TGCCAAGTCCTCCAAGTC</u>	56,0		qRT PCR Primer HCT 1
qHCT1-r	<u>GGTGTGCTCCTAACACCTC</u>	58,8		qRT PCR Primer HCT 1
qHCT2-f	<u>CCTTCCCAACTTCAACCATT</u>	57,9		qRT PCR Primer HCT 2
qHCT2-r	<u>CCTTCCTTTGTTTCCTCGTC</u>	57,9		qRT PCR Primer HCT 2
qHCT5-f	<u>GAGGGAACAAACGCAGAAG</u>	56,7		qRT PCR Primer HCT 5
qHCT5-r	<u>TGCCAGATGTAAGCGGAC</u>	56,0		qRT PCR Primer HCT 5
qPAL1-f	<u>GAATACTCTCCCGAGCAC</u>	56,0		qRT PCR Primer PAL 1
qPAL1-r	<u>GTTCAAAAAGCTTCTCCAG</u>	51,4		qRT PCR Primer PAL 1
qPAL2-f	<u>GAAGCTCATGACTTCCA</u> <u>ACT</u>	58,4		qRT PCR Primer PAL 2
qPAL2-r	<u>GACCGAAAGCACCTTCTTG</u>	56,7		qRT PCR Primer PAL 2
qACT-f	<u>TGTCACCTCACACAGTGCC</u>	56,0		qRT PCR Primer Actin
qACT-r	<u>TGGTGAACACTACCCACG</u>	56,7		qRT PCR Primer Actin
qGAPDH-f	<u>GCAGCGGAAATCAATGGAG</u>	56,7		qRT PCR Primer GAPDH
qGAPDH-r	<u>GGTGATCAACACAGAGAAG</u> <u>AAG</u>	58,4		qRT PCR Primer GAPDH

#### b) Volllängenprimer/Proteinexpressionsprimer

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> Sequenz [°C]	<b>Schnitt-</b> <b>stelle</b>	Bemerkung
AaHCT1-	<u>AAACATATGAGGGGGCCGG</u>	67,6	NdeI	Volllängenprimer für Aa

VLf	<u>CGAGTGTG</u>			HCT 1
AaHCT1-VLr	<u>GGGCTCGAGTCAAGGCTGC</u> <u>AGCAGGAAGGAGGG</u>	67,8	XhoI	Volllängenprimer für Aa HCT 1
Aa_HCT_1_F	<u>AAACATATGAGGGGGCCGG</u> <u>CGAGTG</u>	65,3	NdeI	Kurzer Volllängen- primer für Aa HCT 1
Aa_HCT_1_R	<u>GGGCTCGAGTCAAGGCTGC</u> <u>AGCAGGAAGGAG</u>	64,0	XhoI	Kurzer Volllängen- primer für Aa HCT 1
Aa_HCT1_VL_f_2	<u>AAACATATGAAGCGAATTCT</u> <u>CTTCTACCCACCGG</u>	66,6	NdeI	Neuer Volllängenprimer für Aa HCT 1
AaHCT2-VLf	<u>AAACATATGAGGATTGAAG</u> <u>TCACTCAGACGACGAC</u>	66,7	NdeI	Volllängenprimer für Aa HCT 2
AaHCT2-VLr	<u>GGGCTCGAGTCAGTTGACG</u> <u>AGGAGGAACTCCTCG</u>	66,3	XhoI	Volllängenprimer für Aa HCT 2
Aa_HCT_2_F	<u>AAACATATGAGGATTGAAG</u> <u>TCACTCAGACGAC</u>	63,2	NdeI	Kurzer Volllängen- primer für Aa HCT 2
Aa_HCT_2_R	<u>GGGCTCGAGTCAGTTGACG</u> <u>AGGAGGAACTCCTC</u>	64,4	XhoI	Kurzer Volllängen- primer für Aa HCT 2
AaHCT5-VLf	<u>AAACATATGACGCGCATCA</u> <u>ACTACTTCGC</u>	62,4	NdeI	Volllängenprimer für Aa HCT 5
AaHCT5-VLr	<u>GGGCTCGAGTCAATAAGAC</u> <u>CTGAGAAAGCTTGCC</u>	61,3	XhoI	Volllängenprimer für Aa HCT 5
AaPAL-VLf	<u>AAAGATCTAATGGTGGCCA</u> <u>ACAAGCGCGTGAAGGTGG</u>	71,0	BglII	Volllängenprimer für Aa PAL
AaPAL-VLr	<u>GGCCATGGTCAACCACTGA</u> <u>AGGGGCCAGGAGTGCC</u>	71,0	NcoI	Volllängenprimer für Aa PAL
PAL_F	<u>AAAGATCTAATGGTGGCCA</u> <u>ACAAGCGCGTG</u>	63,7	BglII	Kurzer Volllängen- primer für Aa PAL
PAL_R	<u>GGCCATGGTCAACCACTGA</u> <u>AGGGGCCAGGA</u>	64,0	NcoI	Kurzer Volllängen- primer für Aa PAL
AcPAL-f2	<u>AAAGATCTAATGGAGACCG</u> <u>CGGCCGTCATCCCCAAAT</u>	71,0	BglII	Neuer Volllängenprimer für Aa PAL 1
HCT1_F	<u>GTGCCGCGCGGCAGCCATA</u> <u>TGAGGGGGCCGCGAGTG</u>	65,3		Primer für Fusions PCR von HCT 1 in pET-15b
HCT1_R	<u>GGCAGCAGCCAACTCAGCTT</u> <u>CCTCAAGGCTGCAGCAGGA</u> <u>AGGAG</u>	64,0		Primer für Fusions PCR von HCT 1 in pET-15b
HCT2_F	<u>GTGCCGCGCGGCAGCCATA</u> <u>TGAGGATTGAAGTCACTCA</u> <u>GACGAC</u>	63,2		Primer für Fusions PCR von HCT 2 in pET-15b
HCT2_R	<u>GGCAGCAGCCAACTCAGCTT</u> <u>CCTCAGTTGACGAGGAGGA</u> <u>ACTCCTC</u>	64,4		Primer für Fusions PCR von HCT 2 in pET-15b
PAL_F	<u>GTGCCGCGCGGCAGCCATA</u> <u>TGGTGGCCAACAAGCGCGT</u> <u>G</u>	63,7		Primer für Fusions PCR von PAL in pET-15b
PAL_R	<u>GGCAGCAGCCAACTCAGCTT</u> <u>CCTCAACCACTGAAGGGGC</u> <u>CAGGA</u>	64,0		Primer für Fusions PCR von PAL in pET-15b

**c) Degenerierte und genspezifische Primer für HCT 1**

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> <u>Sequenz [°C]</u>	<b>Schnitt- stelle</b>	Bemerkung
Ac-HCT-f	<u>ACAGGCMTGCCCCATCCGA</u> <u>A</u>	62,4		Degenerierter PCR Primer für HCT
Ac-HCT-r	<u>GTGYGGWGGVTTGACGTTG</u> <u>G</u>	61,7		Degenerierter PCR Primer für HCT
AcHCT_5R T	<u>CCGAAATCACATTCGTAGAT</u> <u>GG</u>	58,4		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für HCT 1
AcHCT_5G SP1	<u>GCTTTGATGAGCTCTGGATG</u> <u>G</u>	59,8		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für HCT 1
AcHCT_5G SP2	<u>GGTTGGATCCAAATCCACTG</u> <u>G</u>	59,8		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für HCT 1
AcHCT_3G SP1	<u>GCTTACAGTCAGGTTGTGTC</u> <u>G</u>	59,8		Genspezifischer 3' RACE PCR Primer für HCT 1
AcHCT_3G SP2	<u>CGACAGCGTTTTGGAAC TTC</u> <u>G</u>	59,8		Genspezifischer 3' RACE PCR Primer für HCT 1
5-AcHCT1n	<u>CGACACAACCTGACTGTAAG</u> <u>C</u>	59,8		Neuer genspezifischer 5' RACE-PCR Primer für HCT 1
5-AcHCT2n	<u>CGAAGTTCCAAAACGCTGTC</u> <u>G</u>	59,8		Neuer genspezifischer 5' RACE-PCR Primer für HCT 1
AcHCT-neu	<u>CCACACAAGAACCTGGTCAC</u>	59,4		Neuer genspezifischer 5' RACE-PCR Primer für HCT 1
Aa_5'GSP_ HCT_1	<u>GATTACGCCAAGCTTCGGCC</u> <u>TACCCACCCGAAATCACAT</u> <u>TC</u>	69,5		Genspezifischer SMART RACE Primer für HCT 1
HCTinv-f	<u>CCTCAGCACCGAGATAGACT</u> <u>CGGC</u>	67,8		HCT 1 Primer für inverse PCR
HCTinv-r	<u>CGGCATATCTCAGACCAAGC</u> <u>TCGC</u>	66,1		HCT 1 Primer für inverse PCR

**d) Genspezifische Primer für HCT 2**

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> <u>Sequenz [°C]</u>	<b>Schnitt- stelle</b>	Bemerkung
Aa_5'GSP_ HCT_2	<u>GATTACGCCAAGCTTGGCCA</u> <u>CCATAACTCCAGAAGTTTGG</u> <u>GC</u>	68,0		Genspezifischer SMART RACE Primer für HCT 2
Aa-HCT5- RT	<u>CGAGGAGGAACTCCTCG</u>	57,6		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für HCT 2
AaHCT5- GSP1	<u>CCAACCTTTCCATATCATCCT</u> <u>C</u>	58,4		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für HCT 2
AaHCT5- GSP2	<u>GGCAAATAAAGACATTGAT</u> <u>AGCCAT</u>	58,1		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für HCT 2

**e) Genspezifische Primer für HCT 3**

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> <u>Sequenz [°C]</u>	<b>Schnitt- stelle</b>	Bemerkung
Aa_HCT_3_GSP1	<u>GGATACTCCACGGACCG</u>	60,5		Genspezifischer 3' RACE PCR Primer für HCT 3
Aa_HCT_3_GSP2	<u>CCCCGTTCAATTTCTGACTGA</u> <u>G</u>	60,3		Genspezifischer 3' RACE PCR Primer für HCT 3
AaHCT3-3-1	<u>GATTACGCCAAGCTTCGGAT</u> <u>ACTCCACGGACCGTCCG</u>	69,6		Genspezifischer SMART RACE Primer für HCT 3
AaHCT3-3-2	<u>GGATTACGCCAAGCTTCCCC</u> <u>TTGTGAAGGACTCGCTTGCG</u>	67,8		Genspezifischer SMART RACE Primer für HCT 3
AaHCT3-3-3	<u>GGATTACGCCAAGCTTCCGA</u> <u>GAAGGGTGAAACGAAATGT</u> <u>CC</u>	64,4		Genspezifischer SMART RACE Primer für HCT 3

**f) Genspezifische Primer für HCT 4**

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> <u>Sequenz [°C]</u>	<b>Schnitt- stelle</b>	Bemerkung
Aa_HCT4_GSP_f	<u>GATTACGCCAAGCTTCCGAT</u> <u>GGCCGGACGATTGAAACG</u>	66,0		Genspezifischer SMART RACE Primer für HCT 4
Aa_HCT4_GSPr	<u>GATTACGCCAAGCTTCCAG</u> <u>CTAGTAATCCAAGGTTGGG</u> <u>G</u>	66,4		Genspezifischer SMART RACE Primer für HCT 4

**g) Degenerierte und genspezifische Primer für PAL**

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> <u>Sequenz [°C]</u>	<b>Schnitt- stelle</b>	Bemerkung
AcPAL_F1	<u>GARCTCATYCGBTTCCTBAA</u> <u>YGCNNGG</u>	66,9		Degenerierter nested PCR Primer für PAL
AcPAL_F2	<u>GCVHTVTCTGYGATGTGAT</u> <u>G</u> <u>GCATGG</u>	66,6		Degenerierter nested PCR Primer für PAL
AcPAL_R1	<u>ACRTCYTGGTTGTGYTGCTC</u> <u>DGC</u>	63,9		Degenerierter nested PCR Primer für PAL
AcPAL_R2	<u>CCAKCCYTCSADRCAYTBSAG</u> <u>SADNNGG</u>	69,2		Degenerierter nested PCR Primer für PAL
AcPAL-3GSP1	<u>GGAAGCCATGGCAATCTCA</u> <u>G</u>	59,4		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für PAL
AcPAL-3GSP2	<u>GGCCGTTGTTGTAGTAGTCG</u>	59,4		Genspezifischer 5' RACE PCR Primer für PAL
AcPAL-5GSPrt	<u>CAGATGGAGGCTGCTGCTA</u>	58,8		Genspezifischer 3' RACE PCR Primer für PAL
AcPAL-5GSP1	<u>GGGTTCTTGATAGGAGCTC</u> <u>G</u>	59,4		Genspezifischer 3' RACE PCR Primer für PAL
AcPAL-5GSP2	<u>CATGGTGGCAACTTCCAGG</u>	58,8		Genspezifischer 3' RACE PCR Primer für PAL
5-AcPAL1n	<u>CGAGCTCCTATCAAGAACCC</u>	59,4		Neuer genspezifischer 5' RACE-PCR Primer für PAL
5-AcPAL2n	<u>TAGCAGCAGCCTCCATCTG</u>	58,8		Neuer genspezifischer 5' RACE-PCR Primer für



				PAL
AcPAL-neu	<u>GCTTGTGAGAATCAACACHC</u> <u>TC</u>	59,0		Neuer 5' RACE-PCR Primer für PAL
Aa_5'GSP_PAL	<u>GATTACGCCAAGCTTCCGCA</u> <u>ATGCGCAACCCCTCCTCC</u>	69,9		Genspezifischer SMART RACE Primer für PAL
AcPAL-VLf	<u>ATGGYWGCMRAWBAGAW</u> <u>C</u>	51,8		Degenerierter Volllängenprimer für PAL (Keine Expression)
AcPAL-VLr	<u>TCAACCAGTGAAGGGG</u>	51,7		Volllängenprimer für PAL (Keine Expression)

#### h) Degenerierte Primer für TAT

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> Sequenz [°C]	<b>Schnitt-</b> <b>stelle</b>	Bemerkung
AcTAT491f	<u>GCWAACATCCTGCTTCCAA</u> <u>GGCC</u>	64,2		Degenerierter Primer für TAT
AcTAT882r	<u>CCAAGTCTCCARCCAGGAAC</u> <u>YATC</u>	64,4		Degenerierter Primer für TAT
degTATf	<u>GCNGAGTATCTNTCTCGNG</u> <u>ATCTYCC</u>	66,4		Degenerierter Primer für TAT
degTATr	<u>GCMAGATGDCRTARACTT</u> <u>CATCAGC</u>	66,4		Degenerierter Primer für TAT
AcTAT-F1	<u>TNRTNATHDCNGAYGARGT</u> <u>NTAYGVNCA</u>	64,3		Hoch degenerierter Primer für TAT
AcTAT-F2	<u>GGNTGGMGNNGGNTGC</u> <u>HTN</u>	64,4		Hoch degenerierter Primer für TAT
AcTAT-R1	<u>ADGCANCCNRNNCKCCANC</u> <u>C</u>	63,1		Hoch degenerierter Primer für TAT
AcTAT-f	<u>GGGGCCAATATACTCATTCC</u> <u>TCGACC</u>	66,4		Primer für TAT
AcTAT-r	<u>CCAGCCAAGGCGCCATCCA</u> <u>GG</u>	67,6		Primer für TAT
TAT-CH-f	<u>CCCTGAGAAGGGTTGGGAN</u> <u>RTNRA</u>	64,4		CODEHOP Primer für TAT
TAT-CH-r	<u>CCGTTAGGATCGCTCGTGRC</u> <u>NADCCANCC</u>	72,1		CODEHOP Primer für TAT

## 2. Weitere/Andere Primer

#### a) Primer für konservierte Bereiche von HCTs aus Lamiaceae

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> Sequenz [°C]	<b>Schnitt-</b> <b>stelle</b>	Bemerkung
DFGWG-f	<u>GAYTTYGGNTGGGG</u>	45,0		DFGWG Primer
RAS-Rn6	<u>CACCGCTTCCCCACCCRA</u> <u>ARTCCGGCTCCTA</u>	76,3		RAS-spezifischer Primer
RAS-Fn7	<u>GCAAACGAGCACTTATC</u> <u>CGACGGCGTCGCCGCC</u>	78,6		RAS-spezifischer Primer

#### b) RACE-PCR Primer nach Scotto-Lavino et al.

(Scotto-Lavino et al. 2007a, 2007b)

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u>	<b>Schnitt-</b>	Bemerkung
------	-----------------	-------------------------	-----------------	-----------

		Sequenz [°C]	stelle	
QT	<u>CCAGTGAGCAGAGTGACGA</u> <u>GGACTCGAGCTCAAGCTTTT</u> <u>TTTTTTTTTTTTT</u>	73,4		Primer für cDNA-Synthese für 3' RACE
Q <sub>o</sub>	<u>CCAGTGAGCAGAGTGACG</u>	58,2		1. Primer für RACE PCR
Q <sub>i</sub>	<u>GAGGACTCGAGCTCAAGC</u>	58,2		2. Primer für RACE PCR

### 3. Primer für *Physcomitrella patens*

#### a) Volllängenprimer/Expressionsprimer für HCTs 1-5

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> Sequenz [°C]	<b>Schnitt- stelle</b>	Bemerkung
Pp_HCT1f	<u>ACAGCTGATGAAGGTCACC</u> <u>AAGTTGGAGGT</u>	60,6	PvuII	Volllängenprimer für PP HCT 1
Pp_HCT1r	<u>TATAAGCTTATCAGTCATCA</u> <u>AGGAGAAACTCTGC</u>	61,0	HindIII	Volllängenprimer für PP HCT 1
Pp_HCT2f	<u>TACTCGAGATATGCCAACTG</u> <u>ACTTGTGAAGAACTC</u>	61,6	XhoI	Volllängenprimer für PP HCT 2
Pp_HCT2r	<u>TGAATTCTATCAGTCATCAA</u> <u>GGAGAAACTCTGC</u>	61,0	EcoRI	Volllängenprimer für PP HCT 2
Pp_HCT3f	<u>TACTCGAGATATGGCCGCC</u> <u>GCAAGTCAAGTT</u>	61,8	XhoI	Volllängenprimer für PP HCT 3
Pp_HCT3r	<u>TGAATTCTATTAGAAGGATG</u> <u>CCACTAGTTTGGC</u>	61,0	EcoRI	Volllängenprimer für PP HCT 3
Pp_HCT4f	<u>CAGCTGATGGGGATCGATG</u> <u>AGGTCACG</u>	61,8	PvuII	Volllängenprimer für PP HCT 4
Pp_HCT4r	<u>TATAAGCTTACTACTCTGCA</u> <u>CAGGAAATATTGGATC</u>	61,6	HindIII	Volllängenprimer für PP HCT 4
Pp_HCT5f	<u>TACTCGAGATATGGGTTCGA</u> <u>ACACGGATGAGAG</u>	62,4	XhoI	Volllängenprimer für PP HCT 5
Pp_HCT5r	<u>TGAATTCTATTACTCGGGGA</u> <u>TGTCGTGAACC</u>	62,1	EcoRI	Volllängenprimer für PP HCT 5

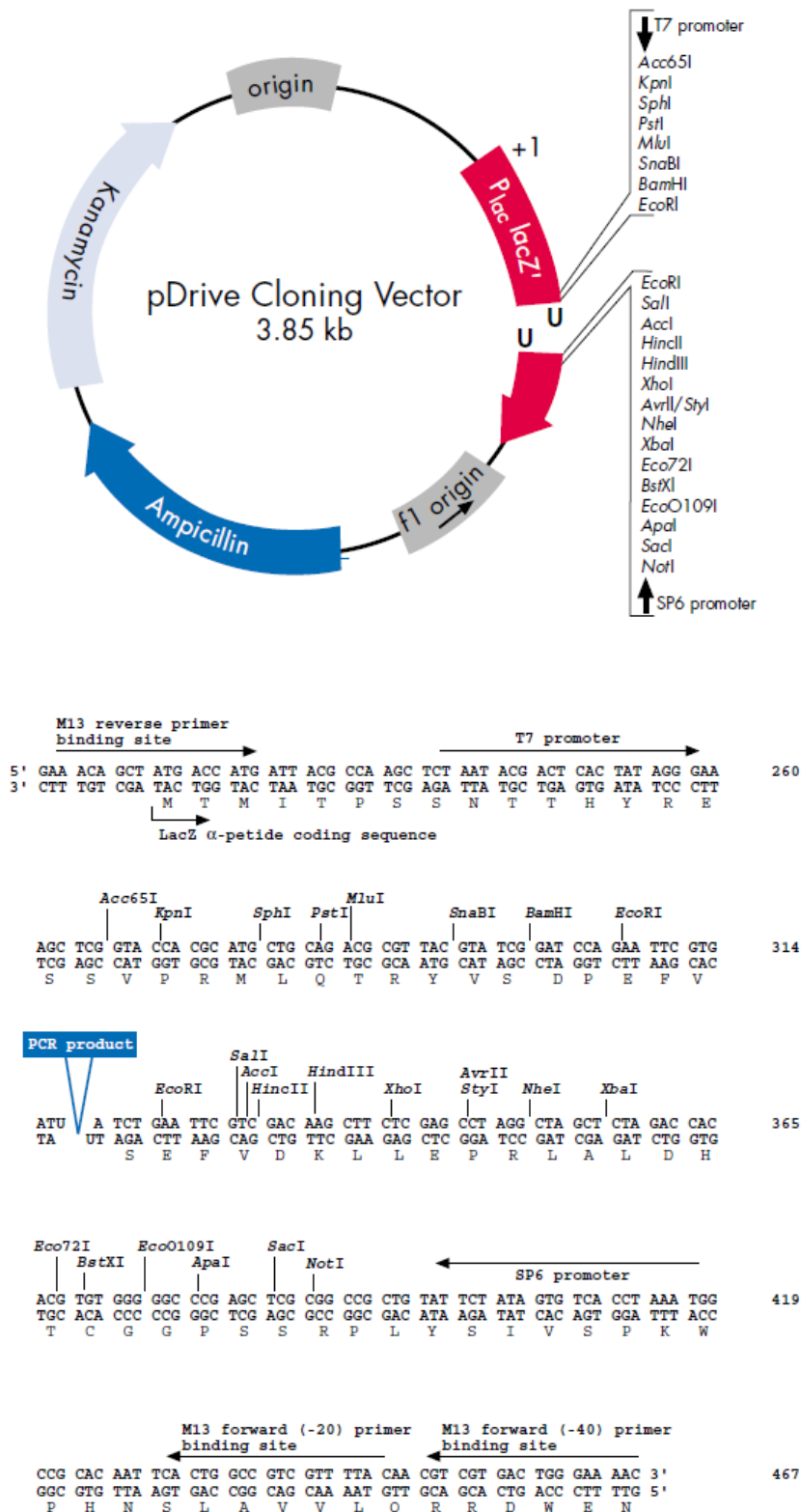
#### b) Sequenzierprimer

Name	Sequenz (5'-3')	Tm der <u>bindenden</u> Sequenz [°C]	<b>Schnitt- stelle</b>	Bemerkung
PpHCT1-seq	<u>GCATGTCCAGAGGGGTAA</u> <u>A</u>	57,3		Sequenzierprimer für Pp HCT 1
PpHCT4-seq	<u>GGTGAAAAATCTGGCTTCC</u>	54,5		Sequenzierprimer für Pp HCT 4

### G. Vektorkarten

Die abgebildeten Vektorkarten wurden den jeweiligen Gebrauchsanweisungen der verwendeten Plasmide entnommen.

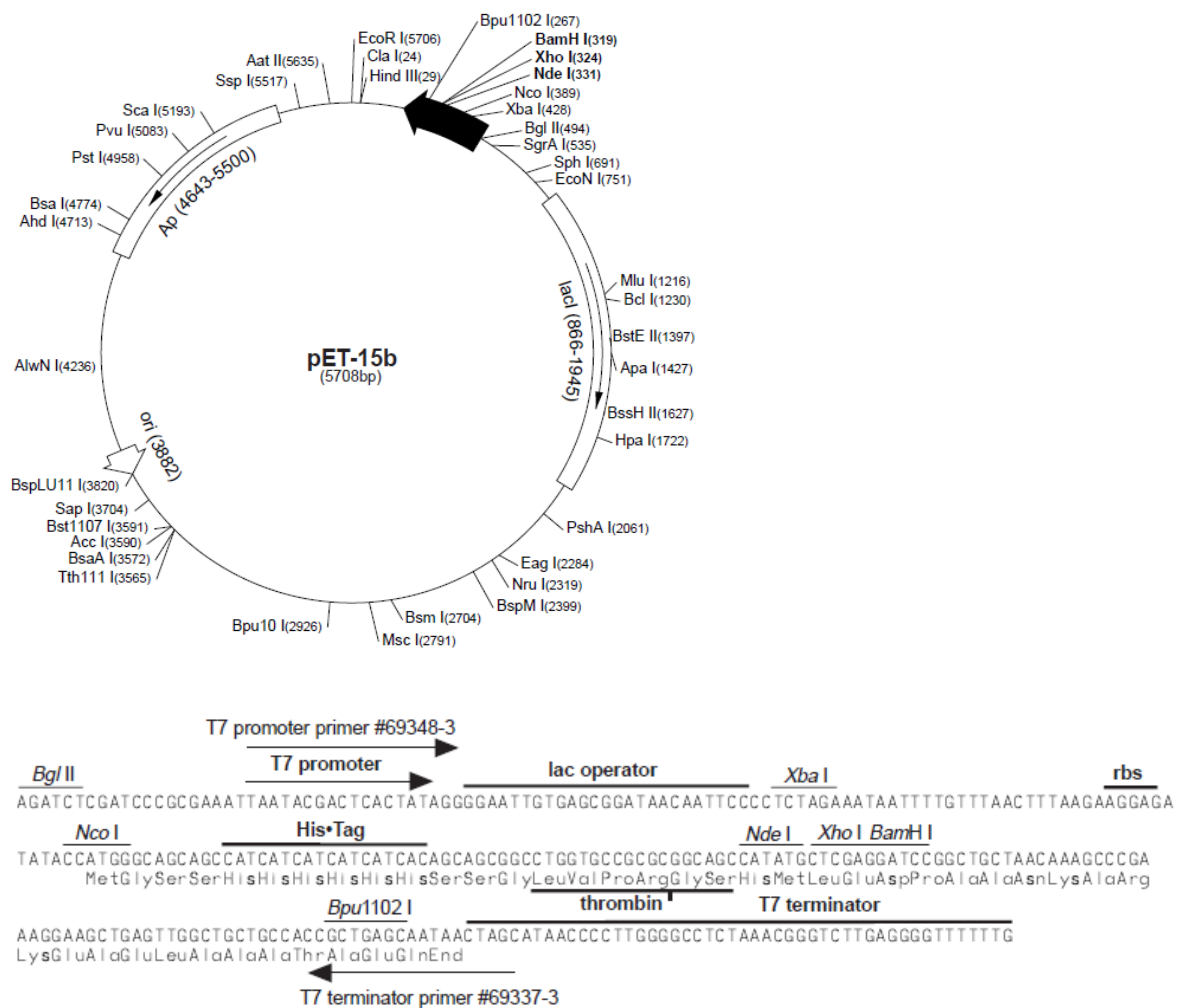
# 1. pDrive



## Positions of various elements

Vector size (bp)	3851
Multiple cloning site	266–393
LacZ $\alpha$ -peptide	216–593
T7 RNA polymerase promoter	239–258
T7 transcription start	256
SP6 RNA polymerase promoter	398–417
SP6 transcription start	400
Ampicillin resistance gene	1175–2032
Kanamycin resistance gene	2181–2993
pUC origin	3668
Phage f1 origin	588–1043
Primer binding sites:*	
M13 forward (–20)	431–447
M13 forward (–40)	451–467
M13 reverse	209–224
T7 promoter primer	239–258
SP6 promoter primer	400–418

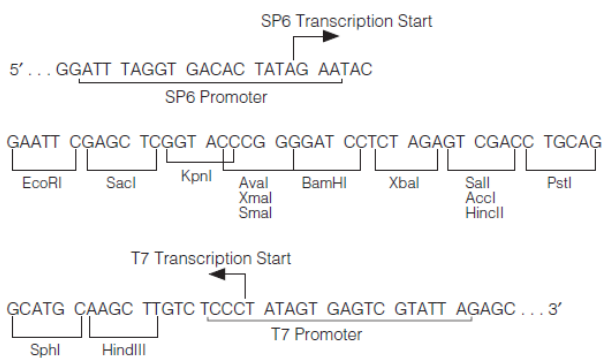
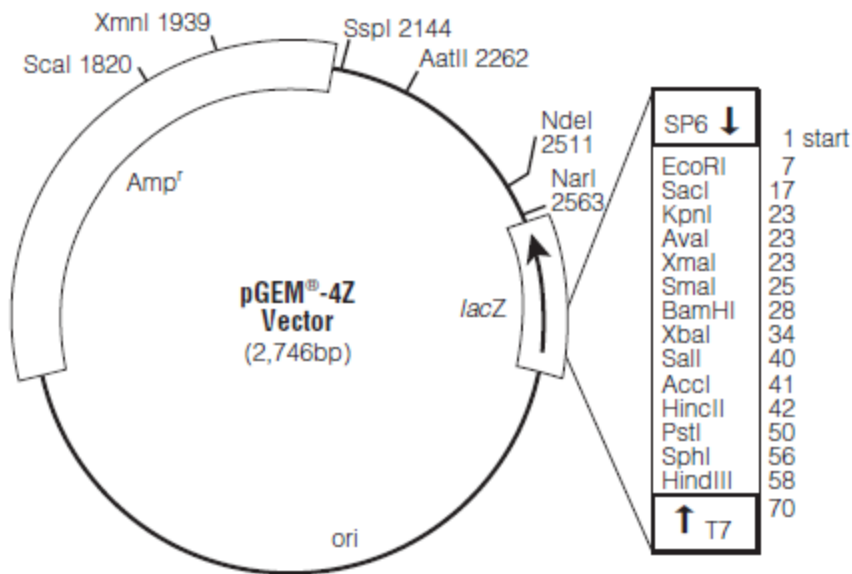
## 2. pET-15b



### pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	453-469
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites	
( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500

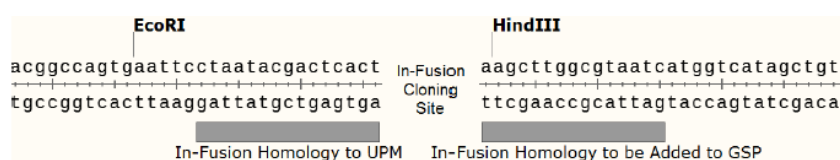
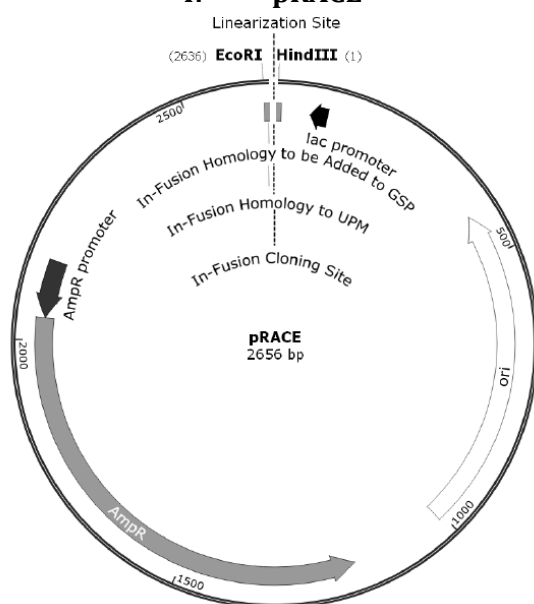
### 3. pGEM-4Z



#### pGEM®-4Z Vector sequence reference points:

SP6 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	7-63
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	68-87
T7 RNA polymerase transcription initiation site	70
<i>lac</i> operon sequences	96-325; 2566-2726
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	106-122
<i>lacZ</i> start codon	110
<i>lacZ</i> operator	130-146
$\beta$ -lactamase ( <i>Amp<sup>r</sup></i> ) coding region	1267-2127
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2686-2702
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2730-3

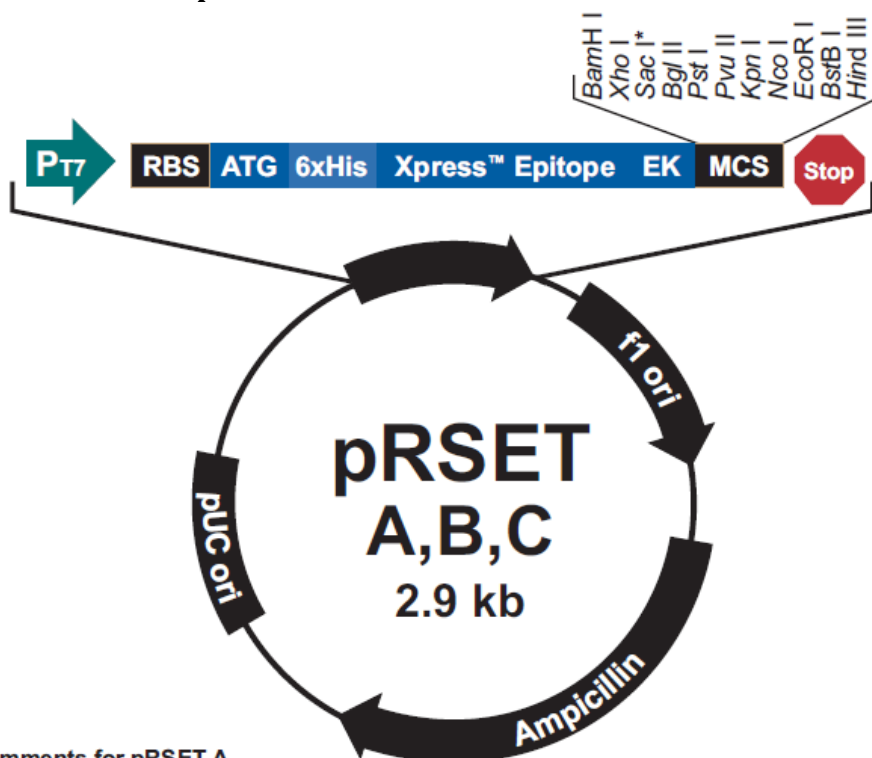
#### 4. pRACE



#### Location of Features (Linearized pRACE Vector)

- In-Fusion Cloning Site (blunt ends, generated by inverse PCR): 1
- In-Fusion Homology to be Added to Gene-Specific Primer (GSP): 1-15
- M13 rev (sequencing primer): 19-35 (complementary)
- *lac* promoter: 67-97 (complementary)
- ori (high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication): 421-1009 (complementary)
- *Amp<sup>R</sup>* (ampicillin resistance gene): 1180-2040 (complementary)
- *Amp<sup>R</sup>* promoter: 2041-2145 (complementary)
- M13 fwd (sequencing primer): 2619-2635
- In-Fusion Homology to Universal Primer Mix (UPM): 2642-2656

## 5. pRSET-C



### Comments for pRSET A 2897 nucleotides

\*Version C does not contain Sac I

T7 promoter: bases 20-39  
 6xHis tag: bases 112-129  
 T7 gene 10 leader: bases 133-162  
 Xpress™ epitope: bases 169-192  
 Multiple cloning site: bases 202-248  
 T7 reverse priming site: bases 295-314  
 T7 transcription terminator: bases 256-385  
 f1 origin: bases 456-911  
 bla promoter: bases 943-1047  
 Ampicillin (bla) resistance gene (ORF): bases 1042-1902  
 pUC origin: bases 2047-2720 (C)

```

      T7 promoter                                     RBS
21  AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA

      Polyhistidine (6xHis) region
91  GATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
      Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

      T7 gene 10 leader      Xpress™ Epitope      BamH I
148 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG ATC
      Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg Trp Ile
      EK recognition site      EK cleavage site

      Xho I      Bgl II      Pst I      Pvu II      Kpn I      Nco I      EcoR I      BstB I      Hind III
205 CGA CTT CGA GAT CTG CAG CTG GTA CCA TGG AAT TCG AAG CTT GAT CCG GCT GCT AAC
      Arg Pro Arg Asp Leu Gln Leu Val Pro Trp Asn Ser Lys Leu Asp Pro Ala Ala Asn

      T7 reverse priming site
262 AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA TAA CTA GCA
      Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Gln Gln ***
  
```

## H. Genotypen der *E. coli* Laborstämme

Die Genotypen wurden den jeweiligen Handbüchern der verwendeten Bakterienstämme entnommen.

### 1. EZ

[F':Tn10(Tc<sup>r</sup>) proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>ΔM15] recA1 end A1 hsdR17(r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA1

### 2. Stellar

F<sup>-</sup>, ara, Δ(lac-proAB) [Φ80d lacZΔM15], rpsL(str), thi, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, dam, dcm

### 3. SoluBL21

F<sup>-</sup>, ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal dcm (DE3)

## I. Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Produkt	Firma	Produkt	Firma
5'-Full RACE Core Set	TaKaRa	PD-10 Columns Sephadex G-25M	GE Healthcare
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment	Roche	PEG 4000	Fermentas
Blocking Reagenz	Roche	PerfeCta® SYBR® Green SuperMix	Quanta
CSPD	Roche	Phusion Polymerase (2 u/μl)	NEB
DreamTaq (5 u/μl)	Fermentas	Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
ExactStart™ Eukaryotic mRNA 5'-&3'-RACE Kit	Epicentre	qScript™ cDNA SuperMix	Quanta
EZ Competent <i>E. coli</i>	Qiagen	Restriktionsenzyme (je 10 u/μl): BglII, BstEII, DraI, EcoRI, EcoRV, HindII, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, PvuII, SmaI, XbaI, XhoI	Fermentas
GBX developer and replenisher	Kodak	Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer
GBX fixer and replenisher	Kodak	RNase H (5 u/μl)	Fermentas
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific	Roti®-Mark Standard	Carl Roth
GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit (5 u/μl)	Promega	SMARTer® RACE 5'/3'-Kit	Clontech
Hifi Polymerase Mix (5 u/μl)	Fermentas	SoluBL21™ Competent <i>E. coli</i>	Ambio
Ni-NTA His-Bind® Superflow	Novagen	Stellar™ Competent <i>E. coli</i>	Clontech
NucleoSpin®-Extract II Kit	Macherey-Nagel	T4 DNA Ligase (5 u/μl)	Fermentas
PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas	T4 RNA Ligase (10 u/μl)	Fermentas
PCR Cloning kit	Qiagen	Tdt (20 u/μl)	Fermentas
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche	TrueStart Polymerase (5 u/μl)	Thermo Scientific

## J. Chemikalienliste

Produkt	Firma	Produkt	Firma
1-Naphthyllessigsäure, NAA	Duchefa	Indol-3-Essigsäure, IES	Duchefa
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	Fluka	Isopropanol p.a.	Roth
2,3-Dihydroxybenzoesäure	Acros organics	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid, IPTG	Roth
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure,	Duchefa	Kaffeesäure	Serva



2,4-D			
2,4-Dihydroxybenzoesäure	Merck	Kaliumacetat	Acros organics
2-Aminobenzoessäure, Anthranilsäure	Sigma	Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1- propanol	Aldrich	Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
3-(4-Hydroxyphenyl)-1- propanol	Aldrich	Kaliumnitrat	Roth
3,4-Dimethoxy-Zimtalkohol		Kaliumchlorid	Roth
3-Hydroxybenzoesäure	Acros organics	Kaliumiodid	Merck
3-Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure	Sigma	Kinetin	Duchefa
4-Cumarsäure	Alfa Aesar	Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	Fluka
4-Hydroxybenzoesäure	Merck	Laurylsarcosin	Sigma
4-Hydroxybenzylalkohol	Aldrich	Lysozym	Fluka
4-Hydroxyphenylpyruvat, pHPP	Sigma-Aldrich	Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth
5,5'-Dithiobis-2- nitrobenzoesäure, DTNB		Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D- Galaktosid, X-Gal	Roth	Maleinsäure	Roth
Aceton p.a.	Roth	Mangan(II)chlorid Heptahydrat	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 37,5:1)	Roth	Mangan(II)sulfat Pentahydrat	Duchefa
Adenosintriphosphat, ATP	Biomol	Methanol p.a.	Fisher Scientific
DL-Äpfelsäure	Merck	D-Milchsäure	Sigma
Agar-Agar	Cero	L-Milchsäure	Sigma
Agarose	Roth	Myo-Inosit	Sigma
$\alpha$ -Ketoglutarat, Natriumsalz	Roth	N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin, TEMED	Roth
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Sigma-Aldrich	NAD <sup>+</sup>	Biomol
Ammoniumsulfat	Roth	NADH <sup>+</sup>	Biomol
Ampicillin	Roth	NADP <sup>+</sup>	Biomol
Ascorbinsäure	Roth	NADPH+H <sup>+</sup> , Natriumsalz	Roth
Borsäure	Roth	Natriumacetat Trihydrat	Merck
Bovines Serum Albumin, BSA	Roth	Natriumchlorid	Roth
Bromphenolblau	Merck	Natriumcitrat	Roth
Caffeoyl-pHPL	Laborfundus	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth
Caffeoyl-Shikimat	Laborfundus	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Calciumchlorid Dihydrat	Roth	Natriumdodecylsulfat, SDS	Roth
Cetyltrimethylammonium- bromid, CTAB	Roth	Natriumhydrogencarbonat	Merck
Chinasäure	Roth	Natriumhydroxid	Merck
Chloroform p.a.	Roth	Natriummolybdat Dihydrat	Fluka
Chlorogensäure	Roth	Natriumtetraborat Decahydrat, Borax	Merck
Cobalt(II)chlorid	Merck	n-Butanol	Alfa Aesar
Coenzym A-Trilithiumsalz Dihydrat	AppliChem	Nickel(II)sulfat Hexahydrat	Roth

Coniferylalkohol	Fluka	Nicotinsäure	
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka	NZ-Amine, Caseinhydrolysat	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka	Ortho-Phosphorsäure	Riedel-de Haën
Diethylether p.a.	Roth	Phenol (Citratpuffer-gesättigt)	Sigma
Dimethylformamid, DMF	Merck	D-Phenylalanin	
Dithiothreitol (DTT)	Serva	L-Phenylalanin	Roth
DL-3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure, DHPL	Laborfundus	Polyclar 10	Ashland Inc.
DL-4-Hydroxyphenylmilchsäure, pHPL	Sigma Aldrich	Polyvinylpyrrolidon, PVP	Sigma Aldrich
DMSO p.a.	Roth	Pyridoxalphosphat, PLP	
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas	Riboflavin	
Dinatrium-EDTA	Roth	Rosmarinsäure	Laborfundus
EDTA	Merck	Saccharose	Haushalts-zucker
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Fluka	Salzsäure	Roth
Eisen(III)chlorid		Shikimisäure	Roth
Essigsäure/Eisessig	Roth	Tetracyclin	Sigma
Essigsäureethylester/ Ethylacetat p.a.	Roth	Thiamin	
Ethanol p.a.	Sigma-Aldrich	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris	Roth
Ethidiumbromid	AppliChem	Trypton/Pepton	Roth
Flüssiger Stickstoff	Linde	Tween 20	Sigma
Glucose	Sigma	L-Tyrosin	Fluka
L-Glutaminsäure		t-Zimtalkohol	Fluka
Glycerol p.a.	Roth	t-Zimtsäure	Aldrich
Glycin	Merck	D-Weinsäure	
Guanidin-HCl	Roth	L-Weinsäure	Roth
Guanidinthiocyanat	Roth	Meso-Weinsäure	
Hefeextrakt	Roth	Xylencyanol	Fluka
Imidazol	Roth	Zink(II)sulfat Heptahydrat	Merck

## K. Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Produkt	Hersteller/Distributor
96-Well qRT-PCR Platten	SPL0960/50	Thermo Scientific
Autoklaven	Systec VX-150	Systec GmbH Labor-Systemtechnik
	AL02-02-100	Advantage-Lab
Bunsenbrenner	Flammy S	Schütt
Expositionskassette	24x30	Rego
Gefriertrockner	Christ L1	B.Braun Biotech
Geldokumentationssysteme	Quick Store „plus“	RS-Laborgeräte
	FAS-Digi	Nippon Genetics
HPLC-Systeme	L-6000 Pump	Merck-Hitachi
	D-2500 Chromato-Integrator	

	Spectro Monitor 3200	LDC Analytical
	Spectra System P 400	Thermo Scientific
	Spectra System SN 4000	
	Spectra System SCM 1000	
	Spectra System UV 1000	
	HP 1090	HP
Konduktometer	Conmet 1W	HANNA
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instr.
Membranpumpe		Vacuubrand
PCR-Geräte	Eppendorf Mastercycler® gradient	Eppendorf
	MyCycler	Bio-Rad
	PikoReal 96	Thermo Scientific
pH-Elektrode	Accumed Basic	Fisher Scientific
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
	UVIKON Spectrophotometer 930	Kontron Instruments
	Specord 200 plus	Analytik Jena
Pipetten	P10ml, P1000, P200, P20, P10N, P2N	Gilson
Refraktometer	HR-18	A. Krüss Optronic GmbH
Röntgenfilm	LumiFilm chemiluminescent detection Film	Boehringer Mannheim
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE120	Büchi
HPLC-Säulen	Equisil ODS	Dr. Maisch HPLC GmbH
	ReproSil Pur C18-AQ	Grom
Schlagmesserhomogenisator	Ultra Turrax T25 Basic	IKA
Spannungsgeber	E835	Consort
	E143	
Vakuumzentrifuge (Speedvac)	Univapo 100 H	UniEquip
Sterilbank	Gelaire Laminar Air Flow Class 100	Gelman Instrument
	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Trockenofen	U40	Memmert
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin
Ultraschallprozessor	UP 200S	Dr. Hielscher
UV-Handlampe	HL-6-KM	Bachofer GmbH
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
	Vortex Mixer	VELP Scientifica
Waagen	PT 310	Sartorius
	EG 300-3M	Kern
	440-35A	
	440-47	
	H64	Mettler

Wasserbäder	SW	Julabo
	Thermomix ME	B.Braun Biotech.
	Thermomix 7P	
Wasserentsalzungsanlage	Essential, Progard TS2, Vent Filter, 12 FO	Millipore
Wippschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instr.
Zellkulturschrank/Inkubator		Jouan
Zellkulturschüttler	Certomat SII	B.Braun Biotech.
		Gallenkamp
Zentrifugen	Biofuge 17RS	Heraeus Sepatech
	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	3-30KS	Sigma
	Sorvall RC6+	Thermo Scientific

Die Pipetten wurden regelmäßig gereinigt und auf eine Genauigkeit von unter 5% Fehler eingestellt. Die Sterilisation im Autoklaven und der Partikelstrom in den Sterilbänken wurden regelmäßig kontrolliert.

## V. Ergebnisse und Diskussion

### A. Kulturverlauf von Suspensionskulturen von *Anthoceros agrestis*

Ziel der Bestimmung eines Kulturverlaufs ist es, verschiedene Daten einer (sterilen) Pflanzenkultur im Verlauf einer definierten Zeit zu erheben und damit eine Arbeitsoptimierung im Umgang mit diesen Pflanzen durchzuführen. Daten, die dabei erhoben werden können, sind Wachstumsparameter wie Frischgewicht, Trockengewicht, Proteingehalt, Mediumsparameter wie Nährstoffgehalt, Leitfähigkeit und pH-Wert, der Gehalt an Metaboliten, Transkriptom- und Proteomanalysen und Enzymaktivitäten. Die Arbeitsoptimierung findet in Hinblick auf Nährstoffgehalt des Mediums, Lichtverhältnisse, Elicitoren und Stressoren oder Erntezeitpunkt statt. Ziel kann dabei die Maximierung des Zielmetaboliten sein, um eine wirtschaftliche Nutzung der Kultur zu ermöglichen, oder die wissenschaftliche Handhabung zu vereinfachen.

Die Kulturverläufe im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem Zeitraum von etwa einem Jahr mit zwei verschiedenen Medien (CB-M, CB-2) je zweimal durchgeführt. Dabei wurde eine Fortführung der Kulturen parallel zum ersten Kulturverlauf gewährleistet, so dass sie für den zweiten Kulturverlauf zur Verfügung standen und vermehrt werden konnten. Somit lässt sie auch eine Aussage über die zeitliche Stabilität der *Anthoceros*-Kulturen machen.

Bei der wöchentlichen Arbeit mit den Suspensionskulturen von *Anthoceros agrestis* fällt auf, dass das Medium trotz sterilen Arbeitens etwa im Zweiwochen-Rhythmus trüb wurde. Mikroskopische Analysen konnten keine Hinweise auf bakterielle Verunreinigung zeigen, auch hatte eine Behandlung der Kultur mit Ampicillin (50 µl 20 mg/ml Ampicillin in 50 ml Medium) zu keiner Veränderung im Trübungsverhalten geführt, so dass angenommen wird, dass es sich hierbei um eine Ölsuspension handelt. Das Öl könnte dabei von den Mooszellen produziert worden sein und durch Lyse freigesetzt werden. Auffallend war nämlich auch, dass die Trübung besonders intensiv war, wenn zuvor die großen mürben Zellagglomerate mit dem perforierten Löffel vor dem Überimpfen zerkleinert wurden. Dabei kann es zum Zerdrücken oder Zerreißen der Zellen kommen und der Inhalt und die Zelltrümmer trüben das Medium.

Interessant an vielen Parametern der Kulturverläufe ist die initiale Gewöhnungsphase nach dem Animpfen des frischen Mediums. Meist ist ein Abfall des beobachteten Parameters an Tag 1 zu beobachten, ähnlich einer Latenz-, Anlauf oder lag-Phase, die in der optischen Dichte von Bakterienkulturen beobachtet werden kann. Dies kann mit einem anfänglichen „Schock“ beschrieben werden, da die Zellen im frischen Medium einer Vielzahl von Nährsalzen und organischen Verbindungen, also einem hohen osmotischen Potential, sowie dem leicht sauren pH und einer kühleren Mediumstemperatur ausgesetzt sind. Diese Phase wird dann spätestens ab dem zweiten Tag wieder abgelöst von den regulären Stoffwechselvorgängen, so dass eine Kontinuität der Verläufe ab dem zweiten Tag beobachtet werden kann.

Bei den Beobachtungen der Kulturcharakterisierung ist immer zu berücksichtigen, dass es sich dabei um Proben handelt, die trotz Bereitstellung optimaler Kulturbedingungen einer Schwankung im Wachstum unterliegen, wie sie für biologische Proben häufig sind. Dies drückt sich in „Ausreißern“ aus, die eine vermeintliche Entwicklung suggerieren, die aber bei kritischer Bewertung der Daten als wenig aussagekräftig zu beurteilen sind. Nicht nur das Wachstum der Pflanze kann hier zu kritischen Werten führen, auch Prozessierungsschritte haben Einfluss auf den Verlauf der Kurven. Dies zeigt sich z.B. eindrucksvoll an Doppelproben für die Bestimmung der Rosmarinsäurederivate, von denen eine Probe nicht vollständig getrocknet werden konnte und somit falsche Werte lieferte.

## 1. Mediumsparameter

Bei den aufgezeichneten Mediumsparametern (Abb. 27-30) handelt es sich um den pH-Wert, die Leitfähigkeit in mS/m und den Zuckergehalt in % (gemessen als Brechungsindex der Lösung). Bei beiden Medien und in beiden Kulturverläufen weisen die Werte die gleichen Tendenzen auf. Der pH-Wert steigt bei beiden Medien von einem Wert zwischen 4,5 und 6 an Tag 0 auf etwa 8 an Tag 7. Im CB-2 Medium (Abb. 29 und 30) gibt es einen kleinen Abfall des pH-Werts zum ersten Tag, bevor er dann steigt.

Die Leitfähigkeit repräsentiert die Menge an gelösten Ladungsträgern, die ein Weiterleiten des elektrischen Stroms ermöglichen können. Dies müssen nicht nur anorganische Ionen, sondern können auch geladene Biomoleküle sein. In allen Medien ist hier ein Abfall des initialen Wertes von 3,5 bis 4,5 mS/m auf einen Wert zwischen 2 und 3,2 mS/m bis zum Ende des Kulturverlaufs zu beobachten.

Der Zuckergehalt ist in erster Linie davon abhängig, ob man ein Medium verwendet hat, das 1 oder 2% Saccharose enthielt. Es ist hier zu bedenken, dass die Werte als Brechungsindex erfasst wurden und somit andere gelöste Substanzen mit lichtbrechenden Eigenschaften Einfluss auf den Wert nehmen. Aber auch hier ist ein Einstellen des finalen Zuckergehalts ab dem achten Tag des Kulturverlaufs zu beobachten, der bei etwa 0,2% liegt.

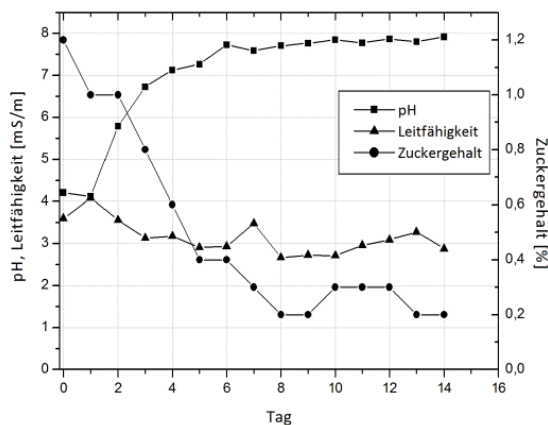


Abbildung 27 Mediumsparameter (pH-Wert, Leitfähigkeit, Zuckergehalt) im ersten Kulturverlauf in CB-M Medium.

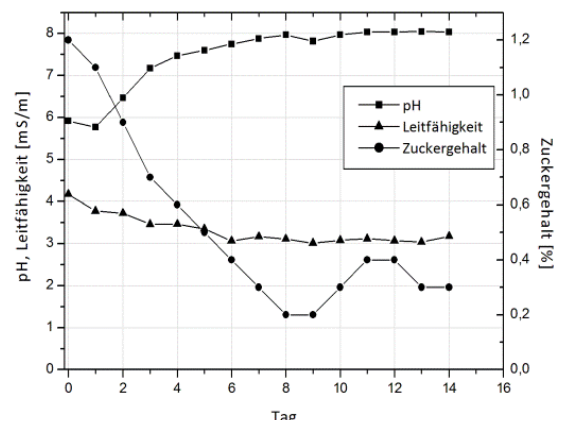


Abbildung 28 Mediumsparameter (pH-Wert, Leitfähigkeit, Zuckergehalt) im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.

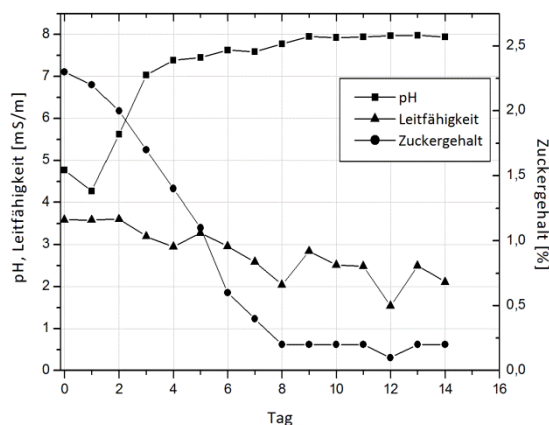


Abbildung 29 Mediumsparameter (pH-Wert, Leitfähigkeit, Zuckergehalt) im ersten Kulturverlauf in CB-2 Medium.

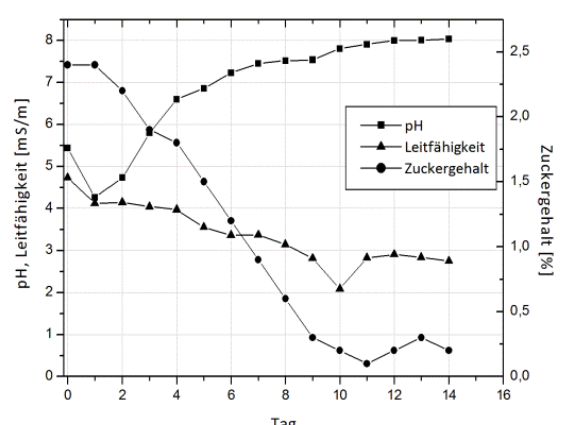


Abbildung 30 Mediumsparameter (pH-Wert, Leitfähigkeit, Zuckergehalt) im zweiten Kulturverlauf in CB-2 Medium.

## 2. Wachstumsparameter

Bei den Wachstumsparametern (Abb. 31-34) kann man insbesondere in CB-2 Medium zwei verschiedene Trends beobachten: Während das Frischgewicht und das Trockengewicht von Beobachtungsbeginn bis zum achten Tag ( $\pm 1$  Tag) stark zunehmen und dann nur noch geringe Änderungen aufweisen (Zunahme, Abnahme oder konstante Werte), ist beim Proteingehalt nur eine Zunahme bis zum vierten Tag ( $\pm 1$  Tag) und danach eine Abnahme zu beobachten (Frischgewicht und Trockengewicht jeweils als g/Kolben, Proteingehalt als g/l Proteinextrakt). Dabei liegen die Frischgewichte zwischen knapp 3 und 4 g an Tag 0 und steigen auf 6-7 g in CB-M an Tag 14 bzw. 8 und 9,5 g in CB-2. Die Trockengewichte liegen bei 0,3 bzw. 0,4 g in CB-M und CB-2 zu Beginn und bei 0,5g in CB-M bzw. 0,7g in CB-2. Der Proteingehalt liegt beim Maximum zu Beginn der Charakterisierung bei 10-13 g/l in CB-2 bzw. 8-11,5 g/l in CB-M und erreicht ab Tag 12 Werte von 4,5-7 g/l.

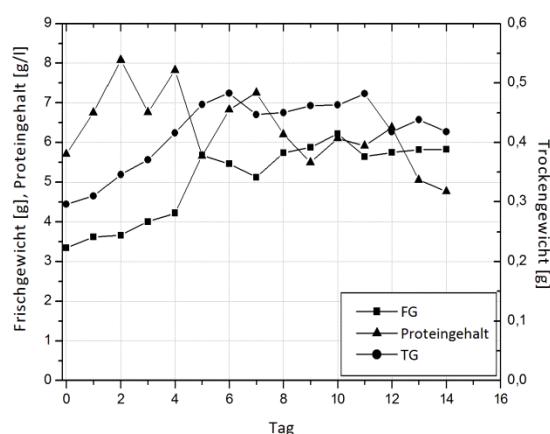


Abbildung 31 Wachstumparameter (Frisch-, Trockengewicht pro Kolben, Proteingehalt des Zellextrakts) im ersten Kulturverlauf in CB-M Medium.

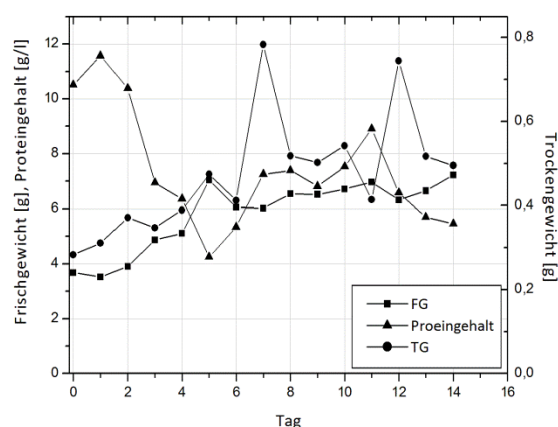


Abbildung 32 Wachstumparameter (Frisch-, Trockengewicht pro Kolben, Proteingehalt des Zellextrakts) im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.

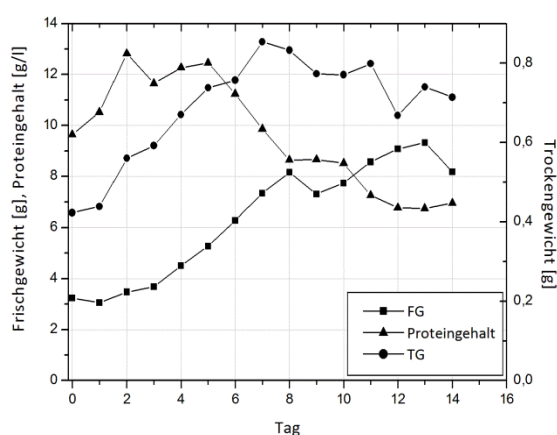


Abbildung 33 Wachstumparameter (Frisch-, Trockengewicht pro Kolben, Proteingehalt des Zellextrakts) im ersten Kulturverlauf in CB-2 Medium.

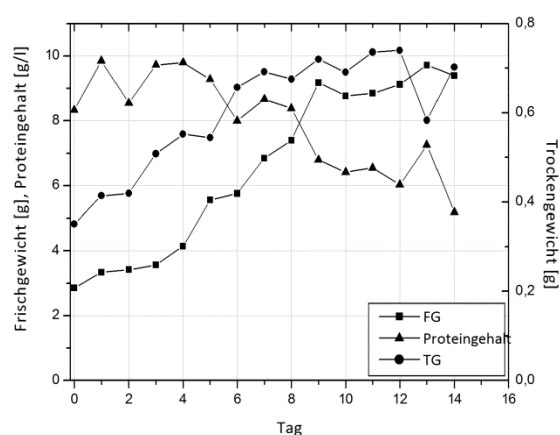
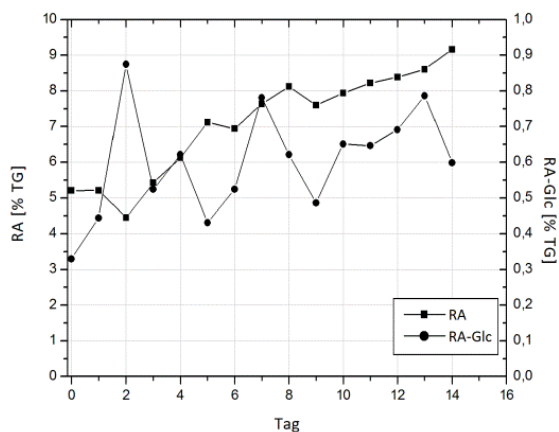


Abbildung 34 Wachstumparameter (Frisch-, Trockengewicht pro Kolben, Proteingehalt des Zellextrakts) im zweiten Kulturverlauf in CB-2 Medium.

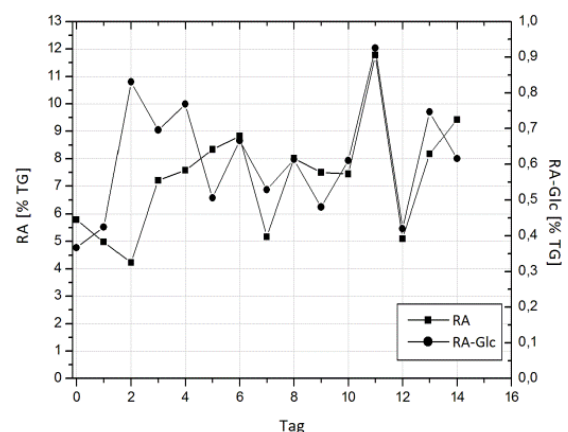
## 3. Gehalt an Rosmarinsäure und Rosmarinsäureglycosid

Der Rosmarinsäure- und Rosmarinsäure-3'-O- $\beta$ -Glucosidgehalt ist entscheidend abhängig vom Medium. Die Rosmarinsäure macht in Zellen aus CB-M (Abb. 35 und 36) anfänglich 5-6% TG aus und

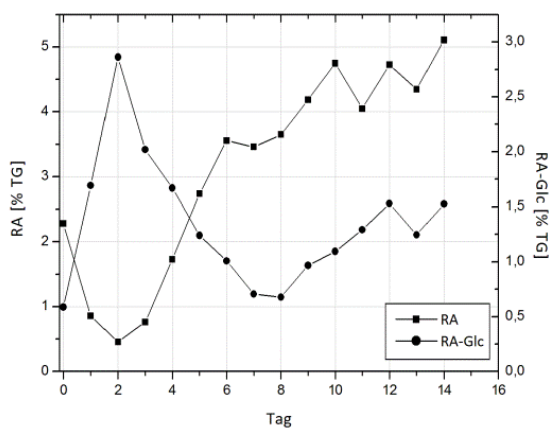
steigt dann auf 9%. Hingegen ist der Gehalt am Glycosid in CB-M gering, zwischen 0,5 und 1% mit einem Maximum um Tag 2 von etwa 0,8-0,9%. Die Werte der Zellen aus CB-2-Medium (Abb. 37 und 38) zeigen eine andere Entwicklung. Der Gehalt an Rosmarinsäure erreicht hier maximal 5%. Ganz eindeutig nimmt er ab dem zweiten oder dritten Tag bis zum Ende des Kulturverlaufs zu, ab dem zehnten Tag pendelt er um die 5% Marke. Der Rosmarinsäureglycosidgehalt ist hier sehr interessant, denn er erreicht ein Maximum von 3% am zweiten Tag und nimmt danach kontinuierlich bis Tag 8 bzw. 10 ab, um dann wieder etwas anzusteigen. Das Maximum an Anfang korreliert mit dem Minimum an Rosmarinsäure zur selben Zeit, was damit erklärt werden kann, dass die überschüssige Glucose im neuen Medium in Form des Rosmarinsäureglycosids gespeichert wird. Ist der Zellglucoselevel wieder abgesunken, wird das Glycosid hydrolysiert und die Glucose steht so wieder der Zelle zur Verfügung. Der höchste Gehalt an Rosmarinsäure wurde bisher in Zellkulturen des Salbei *Salvia officinalis* gefunden. Dabei konnten Werte von bis zu 36% Trockengewicht nachgewiesen werden (Hippolyte et al. 1992). Dieser sehr hohe Wert ist jedoch nicht repräsentativ, in vielen Lamiaceen wurden geringere Werte gefunden, sowohl bei Zellkulturen als auch bei kommerziell erhältlichen und wild gesammelten Pflanzen (Shekarchi et al. 2012). Eine ausführliche Rosmarinsäuregehaltsbestimmung verschiedener Pflanzen wurde in der Dissertation von Yana Abdullah vorgelegt (Abdullah 2010).



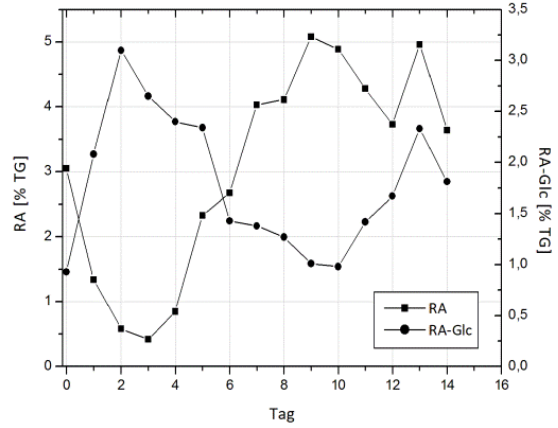
**Abbildung 35** Gehalt an Rosmarinsäure und Rosmarinsäureglycosid in Zellen des ersten Kulturverlaufs in CB-M Medium.



**Abbildung 36** Gehalt an Rosmarinsäure und Rosmarinsäureglycosid in Zellen des zweiten Kulturverlaufs in CB-M Medium.



**Abbildung 37** Gehalt an Rosmarinsäure und Rosmarinsäureglycosid in Zellen des ersten Kulturverlaufs in CB-2 Medium.



**Abbildung 38** Gehalt an Rosmarinsäure und Rosmarinsäureglycosid in Zellen des zweiten Kulturverlaufs in CB-2 Medium.



Die Daten deuten darauf hin, dass in CB-M der prozentuale Gehalt an Rosmarinsäure nach 7 Tagen (zum normalen Überimpftermin) und zum Ende des Kulturverlaufs nach 14 Tagen höher ist als in CB-2, aber dass in CB-2 der Gehalt an Rosmarinsäureglycosid prinzipiell höher ist als in CB-M und am zweiten Tag mit 3% TG sein Maximum hat. Somit eignet sich die CB-2-Kultur zur weiteren Charakterisierung einer möglichen Rosmarinsäure Glycosyltransferase, während für die Extraktion von Rosmarinsäure oder für die Charakterisierung der Rosmarinsäurebiosynthese die Zellen der CB-M Kultur optimal sind. Ferner weisen die Werte darauf hin, dass für diese Charakterisierung 3 bis 5 Tage alte Zellen erfolversprechend sind, da zu diesem Zeitpunkt die Zellen eine hohe Stoffwechselaktivität aufweisen, was sich in hohen mRNA- und Enzymausbeuten wiederfinden lassen könnte. Der hohe Gehalt an Rosmarinsäureglycosid in Zellen des CB-2 Mediums lässt vermuten, dass der hohe Gehalt an Zucker im frischen Medium in der Zelle zu einem osmotischen Schock führt, dessen physiologische Antwort ein Abfangen der Glucose in Form von Glycosiden darstellt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Untersuchung auf das Vorhandensein von Glycosiden bei weiteren Sekundärmetaboliten in den ersten 5 Tagen nach Überimpfen der Zellen in CB-2 Medium. Dass es sich bei dieser Rosmarinsäure nicht um neu synthetisierte Moleküle handelt, erkennt man an der Gegenläufigkeit der Gehalte der Rosmarinsäure und des Glycosids in den ersten fünf Tagen des Kulturverlaufs. Während die Menge an freier Rosmarinsäure abnimmt, steigt der Rosmarinsäureglycosidgehalt, danach fällt der Gehalt an Glycosid und die freie Rosmarinsäure wird freigesetzt. Allerdings findet auch eine permanente Neusynthese der Rosmarinsäure statt, anders ließe sich die Akkumulation der Rosmarinsäure von etwa 10% des Trockengewichts in Zellen aus CB-M Medium nicht erklären. Dass die Synthese des Rosmarinsäureglycosids in diesen Zellen nicht so stark ausfällt, lässt sich mit dem geringeren Zuckergehalt erklären. Die vermehrte Synthese von Rosmarinsäure hingegen könnte zwei verschiedene Ursachen haben: Das geringere Nährstoffangebot in CB-M Medium stellt eine Stresssituation für die Zellen dar, so dass sie mit vermehrter Rosmarinsäureproduktion antworten. Die zweite mögliche Ursache wäre, dass gerade der Mangel an den Nährstoffen zu einem geringeren osmotischen Schock führen, so dass die Zellen Energie in die Produktion von Rosmarinsäure investieren können. Erwartet wäre eigentlich eine höhere Menge an Rosmarinsäure in Zellen aus CB-2 im Vergleich zu CB-M Medium, da diese mehr Energie in Form von Zucker und Aminosäuren (aus Caseinhydrolysat) zur Verfügung stehen haben. Interessant wäre eine Untersuchung von Zellen in Minimalmedium, also ganz ohne Zucker und Aminosäuren, etwa Knop Medium (Bopp und Brandes 1964) oder mit stoffwechsellaktiven Zuckeraustauschstoffen, etwa Inosit oder Zuckeralkoholen, die also nur den osmotischen Stress verursachen jedoch nicht als Kohlenhydratquelle verwendet werden können. Eine Erhöhung der Saccharosemenge wurde von Vogelsang et al. untersucht (Vogelsang et al. 2006). Dabei wurden Zellen von *Anthoceros agrestis* in CB-2 und in CB-4 Medium in einem zweiwöchigen Kulturverlauf untersucht. CB-4 entspricht dem CB-2 Medium jedoch mit 4% Saccharosegehalt. Die Mediumsparameter sind bei Vogelsang und in dieser Arbeit vergleichbar: Die Leitfähigkeit und der Zuckergehalt sind tendenziell abnehmend, der pH hingegen nimmt zu. Die Wachstumsparameter andererseits sind bei Vogelsang größer: Sowohl das Frischgewicht als auch das Trockengewicht pro Kolben haben in ihrer Arbeit höhere Werte angenommen. Der Gehalt an Rosmarinsäure in CB-2 ist in beiden Arbeiten vergleichbar und erreicht etwa 5% des Trockengewichts am Maximum. Jedoch fällt der Wert bei Vogelsang zum Ende des Kulturverlaufs rapide, während er hier konstant bleibt. In CB-4 bleibt der Wert sogar unter 4%. Der Gehalt an Rosmarinsäureglycosid steigt bei Vogelsang weder in CB-2 noch in CB-4 über 1% Trockengewicht. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Erhöhung der Kohlenstoffquelle Saccharose für eine höhere Biomassezunahme sorgt, aber für den Gehalt an Rosmarinsäure nachteilig ist. Das

unterstützt die Annahme, dass die Zellen aus dem CB-M Medium den höheren Gehalt an Rosmarinsäure gegenüber den Zellen aus CB-2 Medium aufweisen, weil sie dem geringeren osmotischen Stress ausgesetzt sind. Es lässt sich in Zusammenhang mit der Arbeit von Vogelsang eine Reihe erstellen für die Biomasse, CB-4>CB-2>CB-M, und für den Rosmarinsäuregehalt CB-M>CB-2>CB-4. Dies gilt allerdings offenbar nur in Hornmoosen. Corinna Weitzel untersuchte nämlich in ihrer Dissertation wiederum verschiedene Parameter von *Melissa officinalis* Zellen in CB-2 und CB-4 Medium und kommt zu dem Ergebnis, dass sowohl die Biomassezunahme als auch der Rosmarinsäuregehalt im Medium mit höherem Zuckergehalt höher ausfallen (Weitzel 2009). Gleiche Tendenzen finden sich auch in der Arbeit von Petersen et al. (Petersen et al. 1994), wo Zellen von *Solenostemon scutellarioides* in den gleichen Medien untersucht wurden. Somit scheint dieser Zusammenhang von Saccharosegehalt und Rosmarinsäureproduktion bei Lamiaceen anders auszufallen: Hier gibt es einen Zusammenhang zwischen Zunahme der Saccharosemenge und Zunahme des Rosmarinsäuregehalts (Gertlowski und Petersen 1993). Es muss jedoch bedacht werden, dass die Hornmooskulturen unter Licht wachsen, somit Photosynthese betreiben können, während die Lamiaceen Dunkelkulturen sind, somit keine Photosynthese betreiben und auf Zucker angewiesen sind.

## **B. Identifikation von Genen der Rosmarinsäurebiosynthese in *Anthoceros agrestis***

Gene aus *Anthoceros agrestis*, die bisher genauer untersucht wurden, waren hauptsächlich DNA-Abschnitte der Chloroplasten und der Mitochondrien. Diese wurden für phylogenetische Untersuchungen sequenziert. Bisher gab es kaum Arbeiten zur Molekularbiologie des Sekundärstoffwechsels dieser Moosart oder anderer Hornmoose. Somit war ein wichtiger Teil dieser Arbeit das Identifizieren dieser Stoffwechselgene und der durch sie codierten Enzyme. Die Isolierung von RNA und DNA aus den Hornmoos-Zellen musste erst aufwendig optimiert werden, da Hornmoose viele phenolische Substanzen enthalten.

Die Identifikation der Rosmarinsäurebiosynthesegene wurde mit Hilfe von RNA und cDNA aus 5 Tage alten Zellen der Suspensionskulturen von *Anthoceros agrestis* durchgeführt (Anhang Abb. 1). Dazu wurden zuerst mit Hilfe degenerierter Primer Mittelfragmente der Gene identifiziert. Die Primer wurden im Falle der HCT und der PAL mit Hilfe der codierenden Vollständigensequenzen homologer Gene aus Pflanzen erstellt. Soweit vorhanden, wurden Sequenzen von Sporenpflanzen (Moose, Moosfarne, Farne, Schachtelhalme, Bärlappgewächse) verwendet, aber auch von Samenpflanzen (z.B. von der Acker-Schmalwand). Es wurden neben Sequenzen für Enzyme mit bekannter Aktivität auch putative Sequenzen verwendet. Bei der PAL und der HCT war diese Methode erfolgreich (Anhang Abb. 2 und 3). Diese Fragmente wurden anschließend mittels RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends) vervollständigt. Für das 3'-Ende wurden klassische RACE-Methoden (Scotto-Lavino et al. 2007a) angewandt, während diese Methode nicht das vollständige 5'-Ende lieferte (Scotto-Lavino et al. 2007b) (Anhang Abb. 4 und 5). Deshalb wurden verschiedene andere Methoden angewandt, wie sie im Methodenteil (V.D.9.-13.) ausführlich beschrieben wurden. Schließlich lieferte die SMARTer-RACE (switching mechanism at 5'-end of RNA transcript) (Chenchik et al. 1998; Bower und Johnston 2010) die entscheidenden Sequenzabschnitte, um die Gene als Volllänge amplifizieren zu können (Anhang Abb. 6). Dabei lieferte aber auch die RLM-Methode (RNA ligase mediated) (Clepet 2004) einen entscheidenden Beitrag, insbesondere bei der Findung weiterer Genkopien der HCT.

Viele PCR-Versuche, insbesondere der 5'-RACE Methode nach Scotto-Lavino, wurden mehrmals wiederholt. Dabei wurden auch einzelne Parameter abgewandelt, etwa die Annealing-Temperatur,

die Primer-Konzentration, das verwendete Templat, die Polymerase, die Magnesiumkonzentration oder Zusätze von DMSO.

Für die einzelnen Methoden, die letztlich nicht zu einem positiven Ergebnis geführt haben, finden sich viele Möglichkeiten, diese zu optimieren:

Die inverse PCR basiert auf dem Gedanken, dass unbekannte Sequenzabschnitte in der gDNA, die eine bekannte Sequenz flankieren, mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Diese Fragmente werden einer Autoligation unterzogen und in der bekannten Sequenz mit einem Restriktionsenzym geschnitten, um die circuläre DNA zu linearisieren. Mit genspezifischen Primern wird die unbekannte Sequenz, die nun von der bekannten umschlossen wird, amplifiziert und kann dann sequenziert werden (Anhang Abb. 7).

Die RAGE-PCR (Rapid amplification of gDNA ends), die von der klassischen RACE-PCR abgeleitet wurde, fängt ebenso mit dem Schneiden von gDNA mit Restriktionsenzymen an, diese Enzyme sind jedoch blunt-end schneidend. Die Schnittprodukte werden polyadenyliert und mit RACE-PCR-Methoden amplifiziert (Anhang Abb. 8). Beide Methoden könnten optimiert werden, indem die Menge an eingesetzter DNA erhöht wird und diese nach dem Restriktionsverdau bei der RAGE-PCR gefällt wird, um sie zu reinigen. Die Adenylierung der Schnittstellen der RAGE-PCR kann auch durch Einsatz einer Taq-Polymerase erfolgen, die bei der Amplifizierung einen kleinen A-Überhang synthetisiert.

Der Ansatz, eine vollständige Sequenz über Southern Blot zu finden, indem man die gDNA mit Restriktionsenzymen schneidet, in einer Gelelektrophorese trennt, nach positiver Gensonden-Hybridisierung das passende Fragment aus einem zweiten Agarosegel ausschneidet und diese für Ligation und Transformation verwendet, hätte optimiert werden können, indem man die Diskrepanz, die zwischen der Verwendung von cDNA für die Gensonde und gDNA für die Analyse steht, auflöst (Anhang Abb. 9). Dies bedeutet, dass man überprüfen muss, ob die gDNA in dem Bereich, der von der Gensonde abgedeckt wird, Introns enthält, die eine Hybridisierung erschweren oder ausschließen. Die DNA-Konzentration und der Restriktionsverdau können hier auch eine entscheidende Rolle spielen. Die sauber geschnittene DNA muss eine gleichmäßige Verteilung im Agarosegel aufweisen. Dies war nicht immer der Fall, manchmal zeigte das Agarosebild eine große Anhäufung von kleinen Fragmenten unter 1000 bp (Anhang Abb. 10). Die Effektivität der Fixierung der DNA durch Hitze wurde mit Hilfe der Gensonde überprüft (Anhang Abb. 11). Die vorherige Übertragung der DNA vom Gel auf die Membran (das Kapillar-blotten) kann jedoch fehlerhaft gelaufen sein. Um dies zu überprüfen, müsste eine Probe der Sonde in der Elektrophorese mitlaufen und dann mit geblottet werden.

Die Methode, die mittels Colony-PCR positive Klonierungsprodukte sucht, indem die verdaute gDNA gelelektrophoretisch getrennt, das Gel dann in kleine Abschnitte geschnitten und extrahiert wurde, um die resultierende DNA nach positiver PCR-Produktbildung (Anhang Abb. 12) zu ligieren und für Transformationen einzusetzen, hatte den entscheidenden Nachteil, dass alle untersuchten Kolonien durch anhaftenden Vektor mit Insert oder nicht ligiertem Insert falsch positive Ergebnisse lieferten (Anhang Abb. 13). Diese Kolonien hatten tatsächlich kein Insert gehabt (Anhang Abb. 14).

Schließlich wurde eine rekombinatorische Methode angewandt, bei der durch Fusions-PCR das Volllängengen in den Vektor hineinamplifiziert werden sollte (Bryksin und Matsumura 2010). Dieser Expressionsvektor sollte dann für heterologe Expression funktioneller Proteine verwendet werden können. Allerdings stellte sich heraus, dass die zweite PCR, also der Einbau des Megaprimers (des Gens) in den Vektor keine Produkte lieferte. Hier kann man davon ausgehen, dass die verwendete Konzentration des Vektortemplats zu gering war. Diese wurde so gering eingestellt, da die Ausbeute

des Megaprimers bei der ersten PCR zu gering war und die Menge an Megaprimer und Vektor nach bestimmten Verhältnissen eingestellt werden mussten.

### 1. Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)

Die PAL aus *Anthoceros agrestis* wurde erstmals mit einer Nested-PCR mit degenerierten Primern nachgewiesen (Anhang Abb. 3). Aufbauend auf dieser Sequenz konnte mittels klassischer RACE das 3'-Ende und mittels SMARTer-RACE das 5'-Ende gefunden werden (Anhang Abb. 5 und 6). Die vollständige Gensequenz ist 2262 bp lang, die 753 Aminosäuren lange Proteinkette hat ein Molekulargewicht von 82,1 kDa.

cDNA-Sequenz einer AaPAL, unterstrichen sind die genspezifischen Primer mit 5'→3' Richtung (Für die vollständige Primerliste siehe Material und Methoden):

```

ATGGTGGCCAACAAGCGCGTGAAGGTGGTGGTGGAGAACGGGAATGGCAACGGGGCGCTGAAGGAGGA
CATCCTCCTGCAGCACCACGAGAACGGATCCGGGCAGGACCACCACATGGAGACCGCGGCCGTCATCC
CCAAATTCTGCTTCGAGCGGGCGGGGGCGAGATCGTGCACGATCCGCTCAACTGGGTGCGCACGTCC
GAGACCCTGGAGGGCAGCCATCTGGACGAGGTGAAGCAGATGGTGGAGGTGTTCTTCGGCTCCGACGA
GGTGGCCATCGAGGGCGTCAATTTGACCGTCCGCCAGGTGACCGCCATCGCGCGCCGCGCCGACGTCA
AGGTCCGCCTCGACGCCGAGGCCGCCAAGCAGCGCGTGCACGACAGCTCCAACCTGGGTGCTGTCCAAC
ATGGCCAAGGGGACTGACACCTACGGCGTCACCACTGGATTTCGGGGCCACCTCGCACAGGAGGACGAT
GCAGGGGGCGGAGCTGCAGAAGGAGCTCATCCGGTTTCTGAACGCGGGGGTGTTCGGGAAGGGGGAGG
GGGAATACTCTCCCGAGCACGGCGGGCCAGGGCGGCCATGCTGGGTGCGGACCAACACGCTGCTGCAG
GGGTTCCTCCGCATCCGGTGGGACATTCTGTGCGCGCTGGAGAAGCTTTTGAACGCGCACGTGACGCC
CAAGCTGCCGCTGCGGGGGACCATCACGGCGTCCGGGGATCTGGTGCCGCTGAGCTACATTGCGGGGC
TGATCACGGCCCGACCCAACTCGCGGTGCTTCACGGCGGAAGGGAAGGAGGTGTCGGCGGAGGAGGGG
                                     ←
TTGCGCATTGCGGGGGTGGCGCAGCCCTTTGTGTTGCAGCCCAAGGAGGGGCTGGCGATTGTGAATGG
←
CACGGCTGTAGGGGCTGCCATGGCTTCCATGGTCTGTTTTGATGCCAACATTCTGGCTGTGATGGCGG
AGGTGATGTCGGCTTTCTTCTGTGAGGTGATGAATGGCAAGCCGGAGTTTACGGATCCTCTGACCCAT
AAGCTGAAGCATCATCCTGGTCAGATGGAGGCTGCTGCTATCATGGAGTGGGTTCTTGATGGGAGCTC
                                     ←→                                     ←→
GTACATGAAGCTGGCTGCCAAGCTGCACGAGACGGACCCTCTGAAGAAGCCCAAGCAGGACAGGTATG
↔
CCCTCCGGACGTCCCCACAGTGGCTGGGGCCTCAGGTTGAGGTCATTCGAGCTGCAACGCACTCCATC
GAGAGGGAGATCAACTCTGTGAATGACAACCCGATCATTGATGCTGCGCGTTCTATTGCTCTGCATGG
                                     →
TGGCAACTTCCAGGGCACTCCCATTGGAGTGTCCATGGACAACATGCGGTTGGCCCTTGCTGCCATTG
→
GGAAGCTCATGTTTGCCAGTTCTCTGAGCTAGTGAACGACTACTACAACAACGGCCTGCCAGCAAC
                                     ←
CTGTCAGGGGGGCCTAACCCGAGCCTGGACTATGGATTCAAGGGTGCTGAGATTGCCATGGCTTCCTA
                                     ←
CACGTCGGAGCTGCAGTTCCTGGCCAACCCTGTGACCAACCACGTGCAATCCGCAGAGCAGCATAACC
AAGACGTGAACTCTCTGGGGCTGGTGTCTGCAAGGAAACTGCAGAATCCATCGAGATTTTGAAGCTC
ATGACTTCCACTTACCTGGTGGCCTTGTGCCAGGCAGTGGATCTCCGGCATCTGGAGGAGAACATGGT
TGCTGTGGTGAAGAAAGTTGTGTCTCGTCTCCAAGAAGGTGCTTTCGGTCGACAACAACGGGGTGT
TGCTACAGACAAGGTTCTGCGAGAAGGAGTTGCTACTTGTGGTGGAGCATCAGGCCCCCTTCACCTAC
ATCGACGATGCTGCCAATGCTTCATACCCTCTCATGCAGAAGCTTCGTCAGGTCCTGGCTGACAGGGC
TTTGAAAAATCCGCCTGCCATAGAGAGGGATGAAAACACATCCCTCTTCTTGAAAATCTCTGCATTTG
AGGAAGAGCTGGTCAAACCTCCTCGAAGAGGAGGTGACAGTGGCGAGGACAGCTTTCGACAAAGGTGCA
GCTGCTGTCCCCAACAGAATTCTGGAATGCCGAACATTCCTCCCTGTACAACCTCGTGCGGTCTGAATT

```

GGGCACACAGATTCTTTGTGGTTTCATCAGAAACCAGTCCCCTGGACAGGACATTGAGAAGGTGTTCCG  
ATGCCATCACTGAGGGTAAGCATGTGGCCCCCTTGCTCAAAGTTCTCGAGGGTTGGCAAGGCACTCCT  
GGCCCCCTTCACTGGTTGA (2262 bp)

Die Proteinsequenz weist die katalytische Triade (unterstrichen) aus Ala-Ser-Gly auf:

MVANKRVKVVVENGNNGALKEDILLQHHENGSGQDHHMETAAVIPKFCFERAGGEIVHDPLNWVRTS  
ETLEGSHLDEVKQMVVEFFGSDEVAIEGVNLTVAQVTAIARRADVKVRLDAEAAKQRVDDSSNWVLSN  
MAKGTDTYGVTGFGATSHRRTMQGAELQKELIRFLNAGVFGKGEGEYSPEHGGPGRPCWVRTNTLLQ  
GFSGIRWDILCALEKLLNAHVTPKLPLRGTTITASGDLVPLSYIAGLITARPNSRCFTAEGKEVSAEEG  
LRIAGVAQPFVLQPKGLAIVNGTAVGAAMASMVCFDANILAVMAEVMSAFFCEVMNGKPEFTDPLTH  
KLKHHPGQMEAAAIMEWVLDGSSYMKLAAKLHETDPLKKPKQDRYALRTSPQWLGPQVEVIRAATHSI  
EREINSVNDNPIIDAARSIALHGGNFQGTPIGVSMNMLALAAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSN  
LSGGPNPSLDYGFKGAEIAMASYTSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLVSARKTAESIEILKL  
MTSTYLVALCQAVDLRHLEENMVAVVKVSVSSKKVLSVDNNGVLLQTRFCEKELLVVEHQAPFTY  
IDDAANASYPLMQKLRQVLADRALKNPPAIERDENTSLFLKISAFEEELVKLLEEEVTVARTAFDKGA  
AAVFNRIELECTFPLYNFVRSELGTQILCGFIRNQSPGQDIEKVFDAITEGKHVAPLLKVLEGWQGTP  
GPFTG- (753 aa)

Eine persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Péter Szövényi von der Universität Zürich zu ersten Sequenzierdaten der nukleären DNA von *Anthoceros agrestis* wurde verwendet, die eigene PAL-Sequenz zu analysieren. In diesen Daten waren zwei längere Sequenzen, die als PAL in Frage kamen: 15078 und 4301. Werden beide Sequenzen mit der hier präsentierten PAL verglichen, so ergibt sich folgendes Bild: Das Alignment (Clustal Ω) mit der Sequenz 15078 ergibt, dass die Sequenz am N-terminalen Ende 38 Aminosäuren länger ist, als die Vergleichssequenz aus der Schweiz. Das C-terminale Ende der Sequenz hat weniger Übereinstimmungen als der Anfang. Unklar ist der Ursprung der Diskrepanz zwischen E183 bis W196. Mit Ausnahme kleiner Punktmutationen mit vermutlich trivialen Auswirkungen auf die Struktur und Aktivität des Enzyms sind die Sequenzen identisch.

Alignment der AaPAL-Aminosäuresequenz mit der translatierten Sequenz 15078 aus dem *Anthoceros agrestis* Genomprojekt (Dr. Péter Szövényi, persönliche Mitteilung):

PAL	MVANKRVKVVVENGNNGALKEDILLQHHENGSGQDHHMETAAVIPKFCFERAGGEIVHD
15078	-----METAAVIPKFCFERAGGEIVHD *****
PAL	PLNWVRTSETLEGSHLDEVKQMVVEFFGSDEVAIEGVNLTVAQVTAIARRADVKVRLDAE
15078	PLNWVRTSETLEGSHLDEVKQMVVEFFGSDEVAIEGVNLTVAQVTAIARRADVKVRLDAE *****
PAL	AAKQRVDDSSNWVLSNMAKGTDTYGVTGFGATSHRRTMQGAELQKELIRFLNAGVFGKG
15078	AAKQRVDDSSNWVLSNMAKGTDTYGVTGFGATSHRRTMQGAELQKELIRFLNAGVFGKG *****
PAL	EGEYSPEHGGPGRPCWVRTNTLLQGFSGIRWDILCALEKLLNAHVTPKLPLRGTTITASGD
15078	EGNTLPSTAA-RAAMLVRTNTLLQGFSGIRWDILCALEKLLNAHVTPKLPLRGTTITASGD ** : * . . . *****
PAL	LVPLSYIAGLITARPNSRCFTAEGKEVSAEEGLRIAGVAQPFVLQPKGLAIVNGTAVGA
15078	LVPLSYIAGLITARPNSRCFTAEGKEVSAEEGLRIAGVAQPFVLQPKGLAIVNGTAVGA *****
PAL	AMASMVCFDANILAVMAEVMSAFFCEVMNGKPEFTDPLTHKLKHHPGQMEAAAIMEWVLD
15078	AMASMVCFDANILAVMAEVMSAFFCEAMNGKPEFTDPLTHKLKHHPGQMEAAAIMEWVLD ***** . *****



```

PAL      GSSYMKLAAKLHETDPLKKPKQDRYALRTSPQWLGPQVEVIRAATHSIEREINSVNDNPI
4301     GSSYMKLAAKLHETDPLKKPKQDRYALRTSPQWLGPQVEVIRAATHSIEREINSVNDNPI
          *****

PAL      IDAARSIALHGGNFQGTPIGVSMNDMRLALAAIGKLMFAQFSELVNDYYNGLPSNLSGG
4301     IDAARSIALHGGNFQGTPIGVSMNDMRLALAAIGKLMFAQFSELVNDYYNGLPSNLSGG
          *****

PAL      PNPSLDYGFKGAEIAMASYTSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLVSARKTAESIE
4301     PNPSLDYGFKGAEIAMASYTSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLVSARKTAESIE
          *****

PAL      ILKLMTSTYLVALCQAVDLRHLEENMVAVVKVSVSSVSKKVLSDNNGVLLQTRFCEKEL
4301     ILKLMTSTYLVALCQAVDLRHLEENMVAVVKVSVSSVSKKVLSDNNG-----
          *****

PAL      LLVVEHQAPFTYIDDAANASYPLMQKLRQVLADRALKNPPAIERDENTSFLKISAFEEE
4301     -----

PAL      LVKLLEEEVTVARTAFDKGAAAVPNRILECRTFPLYNFVRSELGTQILCGFIRNQSPGQD
4301     -----

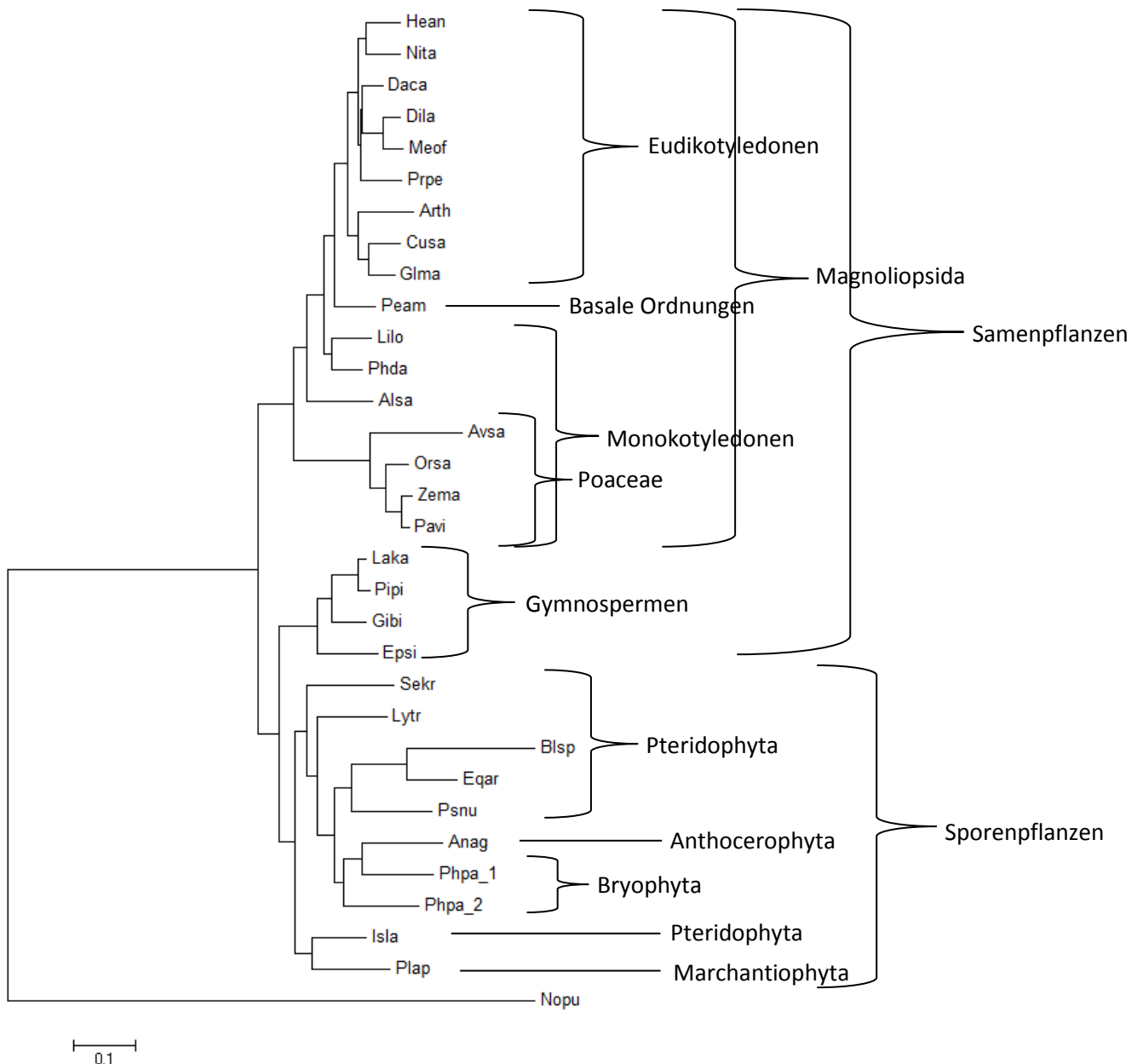
PAL      IEKVFDAITEGKHVAPLLKVLEGWQGTGPGPFTG
4301     -----

```

Da die Daten aus der Schweiz nur vorläufig sind und validiert werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Startcodon sich in beiden Fällen weiter vorne befindet oder das Stoppcodon weiter hinten und die Sequenz somit länger ist. Bekannt ist aus den Sequenzierdaten, dass eine dritte Isoform der PAL bekannt ist, die dazugehörige Sequenz ist allerdings nur knapp 60 Aminosäuren lang. Auffällig sind in beiden Fällen die Übereinstimmungen, die sich entweder am Anfang (15078) oder am Ende (4301) häufen, während ein 290 Aminosäuren langes Mittelstück in beiden Alignments übereinstimmt (P281-A586). Dies kommt daher, dass bei den Amplifizierungen die genspezifischen Primer im Mittelteil des Gens gebunden haben und deshalb vermutlich bei der 5'-RACE eine andere PAL-Isoform amplifiziert wurde als bei der 3'-RACE, dass also die gefundene Sequenz eine Chimäre aus zwei PALs ist. Die Tatsache, dass keine Vollängensequenz, weder mit cDNA noch mit gDNA, mit den gegebenen 5'- und 3'-Primern amplifiziert werden konnte, unterstützt diese Vermutung. Weitere RACE-PCR mit genspezifischen Primern, die mit Hilfe dieser Alignments erstellt werden müssen, sind nötig, um diese These zu verifizieren. Mithin konnte keine Expression einer PAL in *E. coli* durchgeführt werden.

#### a) Phylogenetische Einordnung der PAL

Die phylogenetische Einordnung wurde mit Proteinvollängensequenzen von 31 pflanzlichen PALs mit einer Außengruppe der PAL aus dem Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* erstellt (Abb. 39 und Tabelle 5). Trotz der Annahme, dass es sich bei der gefundenen PAL aus *Anthoceros agrestis* um eine Chimäre handelt, wurde diese Sequenz als eigenständige komplette Sequenz verwendet. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode erstellt und sieht folgendermaßen aus:



**Abbildung 39** Phylogenetischer Stammbaum der PAL. Proteinalignment mit Blossum Algorithmus und Stammbaum mit Maximum-Likelihood-Methode erstellt.

Ganz eindeutig sind zwei Hauptäste auf diesem Baum zu erkennen: Den ersten bilden alle Landpflanzen ohne die Magnoliopsida. Den zweiten bilden die Magnoliopsida. Der erste Ast lässt sich in zwei Zweige einteilen, deren einer Zweig wiederum die Bryophyten (alle vertretenen Horn-, Leber- und Laubmoose) und die Pteridophyten (Gefäßsporenpflanzen) darstellt, während auf dem zweiten Zweig die Coniferopsida und Ginkgoopsida gelistet sind.

Der Ast, der die früheren Angiospermen führt, kann wiederum in zwei wichtige Zweige eingeteilt werden: Der erste Zweig wird hier von den Poaceae gebildet, während alle übrigen Bedecktsamer auf dem zweiten Zweig sind, inklusive der übrigen Einkeimblättrigen und den basalen Ordnungen. Für die PAL aus Mais wurde TAL-Aktivität nachgewiesen (Rösler et al. 1997), bei den anderen drei Gräsern fehlen entsprechende Analysen, aber es wäre denkbar, dass dies auch dort der Fall ist und diese Sonderfunktion in dieser phylogenetischen Zuordnung Ausdruck findet.



Emiliani et al. haben die Phylogenie von 369 PALs, TALs und HALs aus Bakterien, Archaeen, und Eukaryonten untersucht (Emiliani et al. 2009). Sie schlussfolgern, dass HALs und PALs aus Eukaryonten zwar gemeinsame Vorfahren in den Prokaryonten besitzen, aber dass sich in Eukaryonten die eine nicht von der anderen ableitet, sondern das PAL und HAL sich relativ früh trennten. Hingegen haben die PALs aus Pflanzen und aus Pilzen einen monophyletischen Ursprung, der sich parallel zur PAL aus *Nostoc punctiforme* entwickelte. Die pflanzlichen PALs lassen sich auch dort in eine Gruppe der Monokotyledonen PALs (Poaceae), der Dikotyledonen und der frühen Embryophyten und Gymnospermen einteilen. In Grün- und Rotalgen wurden bisher keine PALs gefunden. Die monophyletischen eukaryotischen PALs haben sich in Dikarya und in Landpflanzen unterschiedlich entwickelt, sie waren also entweder mit der Entstehung der Eukaryonten vorhanden und sind bei allen eukaryotischen Gruppen außer diesen beiden verloren gegangen oder wurden durch horizontalen Gentransfer (HGT) von einer Gruppe auf die andere übertragen. Der Ursprung der PAL in diesen Gruppen erklären Emiliani et al. (2009) durch die zweite Möglichkeit, also mit dem Auftreten der PAL in einem Bakterium, einem horizontalen Gentransfer in einen Vorläufer der Dikarya, der eine arbuskuläre Mykorrhiza mit einer frühen Form der Landpflanzen gebildet hat und dabei durch einen weiteren Gentransfer die PAL in Pflanzen etablierte. Dadurch finden sich keine Beweise einer Entwicklung der pflanzlichen aus der pilzlichen PAL, da sich die Entwicklung der rezenten Vertreter der beiden Gruppen erst nach dem HGT der PAL von Pilzen auf Pflanzen vollzogen hat. Xu et al. haben die Gene der Ligninbiosynthese analysiert. In ihrer Publikation (Xu et al. 2009) zeigt sich ein ähnliches Bild: Eine Trennung der Sporenpflanzen sowie der Ein- und Zweikeimblättrigen Pflanzen.

Alles in Allem bestätigt sich in diesem Stammbaum der PAL der derzeitige Forschungsstand der Entwicklung der Landpflanzen.

**Tabelle 5 Verzeichnis der für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaums verwendeten Proteinsequenzen von PALs.**

Abkürzung	Art	Accession number	Abkürzung	Art	Accession number
Alsa	<i>Allium sativum</i>	ADO24189.1	Lytr	<i>Diphasiastrum tristachyum</i> (ehem. <i>Lycopodium tristachyum</i> )	AAW80636.1
Anag	<i>Anthoceros agrestis</i>		Meof	<i>Melissa officinalis</i>	CBJ23826.1
Arth	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC18871.1	Nita	<i>Nicotiana tabacum</i>	M84466.1
Avsa	<i>Avena sativa</i>	ACX47015.1	Nopu	<i>Nostoc punctiforme</i>	NC_010628.1
Blsp	<i>Blechnum spicant</i>	AY803287.1	Orsa	<i>Oryza sativa</i>	CAA34226.1
Cusa	<i>Cucumis sativus</i>	JN675927.1	Pavi	<i>Panicum virgatum</i>	AFY17067.1
Daca	<i>Daucus carota</i>	AB089813.1	Peam	<i>Persea americana</i>	U16130.1
Dila	<i>Digitalis lanata</i>	AJ002221.1	Phda	<i>Phoenix dactylifera</i>	XM_008806995.1
Epsi	<i>Ephedra sinica</i>	BAG74772.1	Phpa	<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001759216.1 XP_001785664.1
Eqar	<i>Equisetum arvense</i>	AY803283.1	Pipi	<i>Pinus pinaster</i>	AY641535.1
Gibi	<i>Ginkgo biloba</i>	ABU49842.1	Plap	<i>Plagiochasma appendiculatum</i>	AIU99853.1

Glma	<i>Glycine max</i>	X52953.1	Prpe	<i>Prunus persica</i>	HM543574.1
Hean	<i>Helianthus annuus</i>	Y12461.1	Psnu	<i>Psilotum nudum</i>	AY803284.1
Isla	<i>Isoetes lacustris</i>	AAW80637.1	Sekr	<i>Selaginella kraussiana</i>	AAW80638.1
Laka	<i>Larix kaempferi</i>	KF515232.1	Zema	<i>Zea mays</i>	Q8VXG7.1
Lilo	<i>Lilium longiflorum</i>	GQ165724.1			

## 2. Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs)

Auch bei den Hydroxycinnamoyltransferasen wurde mittels PCR mit Hilfe degenerierter Primer zuerst ein Mittelfragment amplifiziert (Anhang Abb. 2), welches dann durch klassische 3'-RACE (Abb. Anhang 4) und 5'-SMARTer-RACE (Anhang Abb. 6) vervollständigt werden konnte. Dabei wurden trotz der Verwendung genspezifischer Primer mehrere unterschiedliche Sequenzen gefunden, die als Hydroxycinnamoyltransferasen identifiziert wurden. In der Reihenfolge ihrer Entdeckung im Verlauf dieser Arbeit wurden sie HCT 1-4 genannt.

Eine zusätzliche HCT 5 wurde erst in Daten von Dr. Szövényi (persönliche Mitteilung) als interessantes Zielprotein identifiziert, die restlichen HCTs haben sich nach Protein-Sequenzalignments als nicht primär interessant für diese Arbeit erwiesen.

### a) HCT 1

HCT 1 ist die erste HCT, die in *Anthoceros* identifiziert wurde. Die codierende Gensequenz galt zunächst als 1473 bp lang, die gDNA Sequenz besitzt mindestens zwei Introns von 98 bzw. 99 bp Länge (fett). Es wurden Vollängenprimer für die HCT 1 erstellt, dabei wurden als Startcodon sowohl das erste ATG als auch das ATG ab Position 121 (unterstrichen) verwendet, da HCTs üblicherweise die basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin an erster Stelle nach Methionin aufweisen und sowohl AGG als auch AAG, also die zwei ersten Codons nach diesen beiden ATGs sowohl für Arginin als auch für Lysin codieren. Darüber hinaus ist eine Länge von 1352 bp (ab dem zweiten ATG) durchaus im üblichen Bereich für diese Genfamilie.

Putative gDNA-Sequenz der AaHCT1:

ATGAGGGGGCCGGCGAGTGTGCGGATGCTGGATGTGAAGACCGTGGTGCCTGCGGAGCCGACGCAGCC  
GCACCATCTCTTCCCTCACCTGCTTCGACATCCACATGTGGCACTCGCCTTACATGAAGCGAATTCTCT  
TCTACCCACCGGGAGGCGGGGGCGGGGAGGGATTCTTTCGAATTGGTGGCTGGGCTTAGCGGGAGCCTG  
GCCGAGGCCCTGGTGCTCTTCTACCCGTACGCTGGGCGGATGGTGGAGCGTGAAGAAGGGCAACGCC  
CAGTCTGGAGTGCAATGACGCAGGCGTGCAGTTCGTGACCGCGGAGGCCACGGTTTCTCTGGAGGATT  
TGGGGCCGGGGCTGGATCCCGATCCCGACGTCTTCCCGACCTGCTTCACGCCGGGCCGGAGAGTGTG  
AAGGAGGGCCCCGACTTCCCGCTGCTCTGCGTGCAAGTGACCAGGTTCTTGTGTGGAGGGATTGCGCT  
GGGGCTGGCTTACAGTCAGGTTGTGTGCGGATGCGACAGCGTTTGGAACTTCGTGCGAGCTTGGTCTG  
AGATATGCCGGAACAGGGACTGTCTGTGCTGCCAAGCACAGGCGGTATCTGCTCAAGGTTACCGAC  
CTCAGCACCGAGATAGACTCGGCTGAATTCCATCCCACCCTGTACACTTTCACCGACCCGTGGAAAGC  
CAAGATGAAGAGAAATGGCAAGGCTGGTGTGTAAGGGACTACCCACCTTCGTCCCCTCTGTTGCTTC  
AGGAGCGGCAAGTGCATCGTATGTTCTGCTTCTCAGCTGACACCATCCAGAAGCTGAAGGACCTTGCC  
AAGTCCTCCAAGTCCGGCTCCGAGGCTGGGGCTAACAAGTTGAAGCGGCCTGAATCTGAGGCCTTGAG  
GAAAGCTTCGGCTACCAGGGGACAATTCACATCCTTAGAGGTAGGTTTACTAAACTGCCACTCCTCA  
**TTCTTAACCGCTTCTCGCTCCCATCAAAGTGCAGCTACTGGGTTGCTTAAATTGGTGTCTGACAATGT**  
**AGGTGTTAGGAGCACACCTTTGGCGGTGCACCACCAGGGCTCGCAATCCCCCTGGGCATTCGGAAACC**  
AAGTTCGTGATTGAGTCAGACTGCAGAAGAAGGCTTCCTTTCTTGCCAGATTCTATTTTCGGGAATGC  
GGTTTGCTGCACAGCAGCTGTGACCACGGTCAAGGAGCTGGTGGAGAGCCCTCTATACTTCTCTGCCA

AGCTCATCCACAAGGT**TGAGTGCCTGGCACCGAGCAGTGA**ACTCCATAGAGCCCTTCTTCTGAAGACCT  
**AACTGTTATGGTCATTGACAGTT**CAGTGATCCGTTTATGGTGCAGGCCAGGAGAAAGTCTGTCTCGGA  
GCAGTATATCCGGATACTAGTTCACTACTCGGAGCAGCATGGCAACCTGCGGCCAGTGGATTGGATC  
CAACCAGACAGTGTCTCACAACAGCCATCCAGAACTCATCAAAGCATCCCATCTACGAATGTGATTTC  
GGGTGGGGTAGGCCGTTTAGGGTCAGATCCGGCAACATGGATGAGCAGGGAGCGTATGCCATATTTCC  
TGGGAACCCGAAGCTCCCCAAAGGCAGCGTGGAGGTGGCCATTGTGCTCCCGGCAGGAGACATGGCCC  
GCCTGGAGCAGAATCCCTCCTTCCTGCTGCAGCCTTGA

Die Amplifizierung der Vollängensequenz mit dem zweiten Primer war erfolgreich, sodass die tatsächliche codierende Sequenz 1353 bp lang ist (Abb. 40-42). Das Protein besitzt 450 Aminosäuren und ist 49,8 kDa schwer.

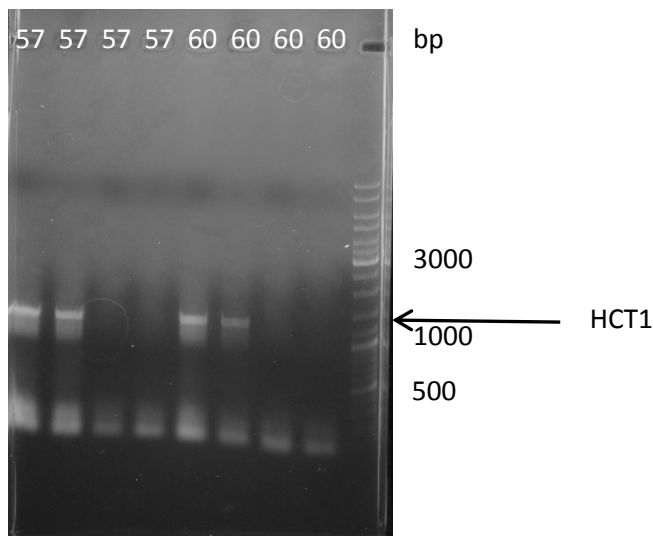


Abbildung 40 PCR von AaHCT1 mit Vollängen-Primern Aa\_HCT1\_VL\_f\_2 und AaHCT1-VLr (Konzentration der Primerlösung 100  $\mu$ M), Temperatur 57 und 60  $^{\circ}$ C, erwartet 1353 bp, erhalten ~1300 bp. Die Taschen 3, 4, 7 und 8 wurden jeweils mit weniger PCR-Produkt beladen.

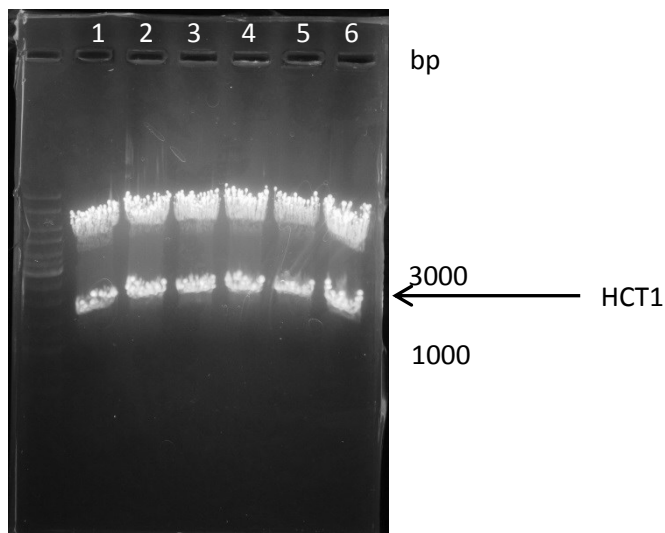


Abbildung 41 Doppelverdau von pDrive[AaHCT1] mit NdeI und XhoI, *E. coli* Klone 1-6.

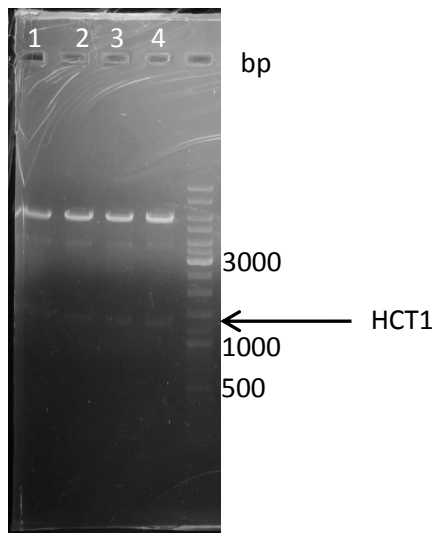


Abbildung 42 Doppelverdau von pET-15b[AaHCT1] mit NdeI und XhoI, *E. coli* Klone 1-4.

cDNA-Sequenz der AaHCT1, unterstrichen sind die genspezifischen Primer mit 5'→3' Richtung (Für die vollständige Primerliste siehe Material und Methoden):

```

ATGAAGCGAATTCTCTTCTACCCACCGGGAGGCGGGGGCGGGGAGGGATTCTTCGAATTGGTGGCTGG
GCTTAGCGGGAGCCTGGCCGAGGCCCTGGTGCTCTTCTACCCGTACGCTGGGCGGATGGTGGAGCGTG
AAGAAGGGCAACGCCCCAGTCTGGAGTGCAATGACGCAGGCGTGCAGTTCGTGACCGCGGAGGCCACG
GTTTCTCTGGAGGATTTGGGGCCGGGGCTGGATCCCGATCCCGACGTCTTCCCCGACCTGCTTCACGC
CGGGCCGGAGAGTGTGAAGGAGGGCCCCGACTTCCCGCTGCTCTGCGTGCAAGTGACCAGGTTCTTGT
                                     ←
GTGGAGGGATTGCGCTGGGGCTGGCTTACAGTCAGGTTGTGTGCGGATGCGACAGCGTTTTGGAACCTC
←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←
GTGCGAGCTTGGTCTGAGATATGCCGGAACAGGGACTGTCTGTGCTGCCCAAGCACAGGCGGTATCT
◇
GCTCAAGGTTACCGACCTCAGCACCGAGATAGACTCGGCTGAATTCCATCCCACCCTGTACACTTTCA
CCGACCCGTGGAAAGCCAAGATGAAGAGAAATGGCAAGGCTGGTGCTGTAAGGGACTACCCACCTTCG
TCCCCTCTGTTGCTTCAGGAGCGGCAAGTGCATCGTATGTTTCGTCTTCTCAGCTGACACCATCCAGAA
GCTGAAGGACCTTGCCAAGTCTCCAAGTCCGGCTCCGAGGCTGGGGCTAACAAGTTGAAGCGGCCTG
AATCTGAGGCCTTGAGGAAAGCTTCGGCTACCAGGGGACAATCACATCCTTAGAGGTGTTAGGAGCA
CACCTTTGGCGGTGCACCACCAGGGCTCGCAATCCCCCTGGGCATTTCGAAACCAAGTTCGTGATTGA
GTCAGACTGCAGAAGAAGGCTTCCTTTCTTGCCAGATTCTATTTTCGGGAATGCGGTTTGCTGCACAG
CAGCTGTGACCACGGTCAAGGAGCTGGTGGAGAGCCCTCTATACTTCTCTGCCAAGCTCATCCACAAG
GCCAGGAGAAAGTCTGTCTCGGAGCAGTATATCCGGATACTAGTTCACTACTCGGAGCAGCATGGCAA
CCTGCGGCCAGTGGAATTTGGATCCAACCAGACAGTGTCTCACAACAGCCATCCAGAACTCATCAAAGC
      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←
ATCCCATCTACGAATGTGATTTTCGGGTGGGGTAGGCCGTTTAGGGTCAGATCCGGCAACATGGATGAG
      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←      ←
CAGGGAGCGTATGCCATATTTCTTGGAACCCGAAGCTCCCCAAAGGCAGCGTGGAGGTGGCCATTGT
GCTCCCGGCAGGAGACATGGCCCGCTGGAGCAGAATCCCTCCTTCCTGCTGCAGCCTTGA

```

Translatierte Aminosäuresequenz der AaHCT1:

```

MKRILFYPPGGGGEGFFELVAGLSGSLAEALVLFYPYAGRMVEREEGQRPSLECNDAGVQFVTAEAT
VSLEDLGPGLDPDPDVPDLLHAGPESVKEGPDFLLLCVQVTRFLCGGIALGLAYSQVVSDATAFWNF
VRAWSEICRKQGLSVLPKHRRYLLKVTDLSTEIDSAEFHPTLYTFTDPWKAKMKRNGKAGAVRDYPPS
SPLLLQERQVHRMFVFSADTIQKLKDLAKSSKSGSEAGANKLKRPESEALRKASATRGQFTSLEVLGA
HLWRCTTRARNPPGHSETKFVIESDCRRRLPFLPDSYFGNAVCCTAAVTTVKELVESPLYFSAKLIHK

```

ARRKSVSEQYIRILVHYSEQHGNLRPVDLDPTRQCLTTAIQNSSKHPIYECDFGWGRPFRVRSNMDE  
QGAYAI FPGNPKLPKGSVEVAIVLPAGDMARLEQNPSFLLQP-

Ungewöhnlich an dieser Sequenz sind die üblicherweise konservierten Bereiche (unterstrichen). Während das DFGWG Motiv vorhanden ist, weist das HXXXDG Motiv eine starke Abweichung von den bisher beschriebenen BAHD-Acyltransferasen auf. Hier liegt ein QVVSDA Motiv vor. St. Pierre und De Luca (St. Pierre und de Luca 2000) beschreiben die drei X als häufig unpolare Aminosäuren, etwa als Leucin, Isoleucin, Valin oder Methionin. Während ein Austausch des Glycins gegen Alanin ebenfalls beschrieben wurde, gelten das Histidin und das Aspartat als hochkonserviert, da gerade das Histidin für die katalytische Aktivität verantwortlich ist. Dieses Histidin wurde hier durch ein Glutamin ersetzt. Glutamin und Histidin teilen sich die ersten beiden Positionen des Codons CAN. Somit kann eine Punktmutation für diese Änderung verantwortlich sein. Da eine Polymerase mit Lesekorrekturefunktion verwendet wurde, gilt eine amplifikationsbedingte Änderung als unwahrscheinlich. Der Sequenzvergleich nach Durchsuchen der Proteindatenbank mit BLASTp ergab die höchste Übereinstimmung der HCT 1 mit BAHD-Acyltransferasen aus dem Moosfarn *Selaginella moellendorffii* (XP\_002990807.1, 32% Identität) sowie eine 30%ige Identität mit der HCS/QT 2 aus der Rutenhirse *Panicum virgatum* (AGM90558.1), bei der die Enzymaktivität bereits nachgewiesen wurde (Shen et al. 2013).

Erneut wurde ein Alignment mit den Daten von Dr. Szövényi erstellt. Dabei ist die Übereinstimmung der HCT 1 mit der Sequenz 31166 zu beobachten, ausgenommen den 81 Aminosäuren, die die HCT 1 am N-terminalen Ende aufweist und die bei 31166 fehlen. Somit besitzt auch die Sequenz aus unabhängigen Sequenzierungsdaten nicht das typische HXXXDG-Motiv.

Alignment der AaHCT1-Aminosäuresequenz mit der translatierten Sequenz 31166 aus dem *Anthoceros agrestis* Genomprojekt (Dr. Péter Szövényi, persönliche Mitteilung):

```
HCT_1      MRGPASVRMLDVKTVPAPAEPTQPHHLFLTCTFDIHMWHSPYMKRILFYPPGGGGGEGGFEL
31166      -----

HCT_1      VAGLSGSLAEALVLFYPYAGRMVEREEGQRPSLECNDAGVQFVTAEATVSLEDLGPGGLDP
31166      -----MVEREEGQRPSLECNDAGVQFVTAEATVSLEDLGPGGLDP
                      *****

HCT_1      DPDVFDPDLLHAGPESVKEGPDFPFLLCVQVTRFLCGGIALGLAYSQVVS DATAFWNFVRAW
31166      DPDVFDPDLLHAGPESVKEGPDFPFLLCVQVTRFLCGGIALGLAYSQVVS DATAFWNFVRAW
                      *****

HCT_1      SEICRKQGLSVLPKHRRYLLKVTDLSTEIDSAEFHPTLYTFTDPWKAKMKRNGKAGAVRD
31166      SEICRKQGLSVLPKHRRYLLKVTDLSTEIDSAEFHPTLYTFTDPWKAKMKRNGKAGAVRD
                      *****

HCT_1      YPPSSPLLQERQVHRMFVFSADTIQKLKDLAKSSKSGSEAGANKLRPESEALRKASAT
31166      YPPSSPLLQERQVHRMFVFSADTIQKLKDLAKSSKSGSEAGANKLRPESEALRKASAT
                      *****

HCT_1      RGQFTSLEVLGAHLWRCTTRARNPPGHSETKFVIESDCRRRLPFLPD SYFGNAVCCTAAV
31166      RGQFTSLEVLGAHLWRCTTRARNPPGHSETKFVIESDCRRRLPFLPD SYFGNAVCCTAAV
                      *****

HCT_1      TTVKELVESPLYFSAKLIHKARRKSVSEQYIRILVHYSEQHGNLRPVDLDPTRQCLTTAI
31166      TTVKELVESPLYFSAKLIHKARRKSVSEQYIRILVHYSEQHGNLRPVDLDPTRQCLTTAI
                      *****
```

```

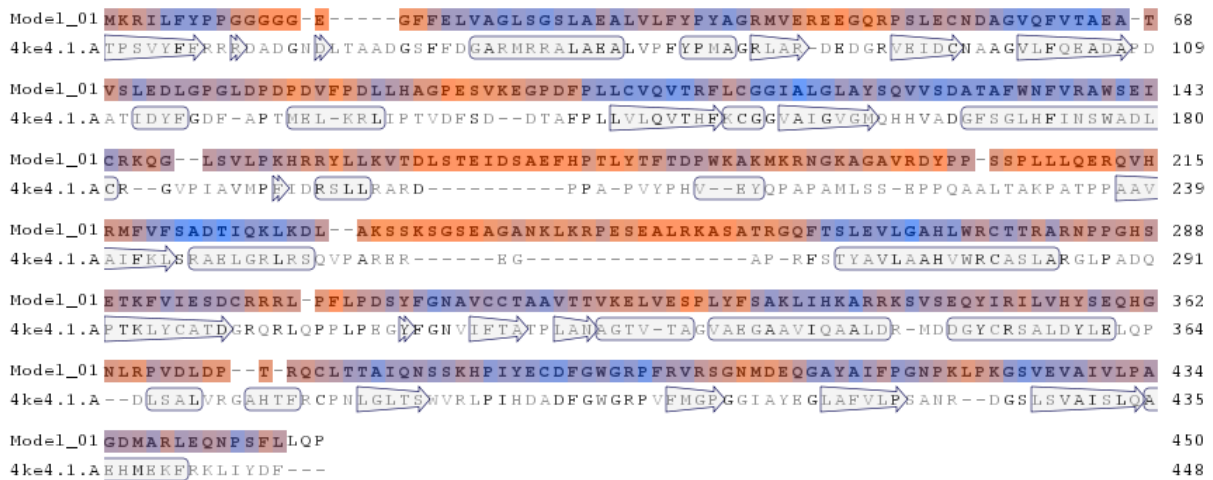
HCT_1      QNSSKHPIYECDFGWGRPFVRVSGNMDEQGAYAIFFPGNPKLPKGSVEVAIVLPAGDMARL
31166      QNSSKHPIYECDFGWGRPFVRVSGNMDEQGAYAIFFPGNPKLPKGSVEVAIVLPAGDMARL
          *****

HCT_1      EQNPSFLLQP
31166      EQNPSFLLQP
          *****

```

### (1) Strukturvorhersage für AaHCT1

Ein Alignment der Sekundärstruktur der HST aus der Sorghumhirse *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013), die kristallographisch aufgeklärt wurde (PDB 4ke4.1.A), mit der HCT 1 liefert folgendes Bild (Swiss-Model) (Abb. 43):



**Abbildung 43** Sekundärstrukturalignment von HCT 1 auf der Basis der bekannten Struktur der HST aus *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013). Pfeile = Faltblätter, Quadrate = Schleifen, rot = schlechte Qualität, blau = gute Qualität.

Model\_01 ist die Sequenz der *Anthoceros* HCT. Pfeile repräsentieren Faltblattstrukturen, Quadrate zeigen Helices an. Farblich dargestellt ist der qmean4-Wert (Qualitative Model Energy Analysis) (Benkert et al. 2011), ein aus vier Parametern berechneter Wert, der die Qualität des Modells angibt. Blau steht dabei für hohe Qualität (und damit für eine passende Übereinstimmung), rot für schlechte Qualität. Besonders auffällig sind hier die drei großen roten Sequenzbereiche in der Mitte des Proteins, die sich bei der SbHST tatsächlich am Rand des Proteins befinden und dort Schleifen darstellen. Diese Schleifen scheinen demnach bei HCT1 aus *Anthoceros* anders gestaltet bzw. länger zu sein.

### b) HCT 2

Die zweite HCT wurde im Zuge der 5'-RACE mit dem RACE Kit der Firma Epicentre gefunden. Dabei fehlte noch das 5'-Ende des Gens, welches dann mit dem SMARTer-RACE Kit von Clontech identifiziert wurde. Das Gen umfasst 1296 bp (Abb. 44-46), das Protein ist 431 Aminosäurereste lang mit einem Molekulargewicht von 47,3 kDa. Da HCT 2 nicht aus gDNA vervielfältigt werden konnte, können keine Aussagen über Introns dazu getroffen werden.

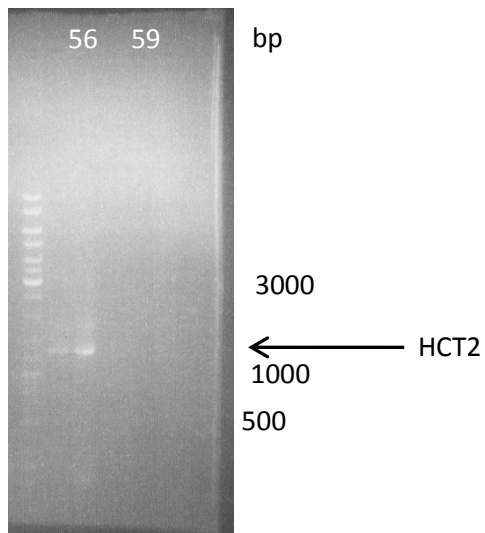


Abbildung 44 PCR von AaHCT2 mit Vollängenprimer Aa\_HCT\_2\_F und Aa\_HCT\_2\_R (Konzentration der Primerlösung 10  $\mu$ M), Temperatur 56 und 59 (jede Temperatur mit zwei Geltaschen) °C, erwartet 1296 bp, erhalten ~1300 bp.

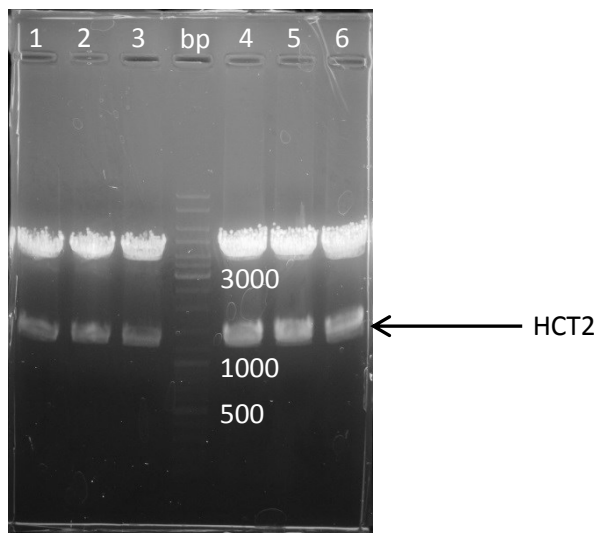
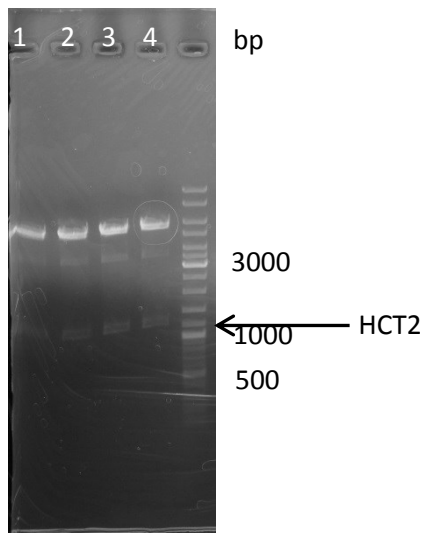


Abbildung 45 Doppelverdau von pDrive[AaHCT2] mit NdeI und XhoI, *E. coli* Klone 1-6.



**Abbildung 46 Doppelverdau von pET-15b[AaHCT2] mit NdeI und XhoI**

cDNA-Sequenz der AaHCT2, unterstrichen sind die genspezifischen Primer mit 5'→3' Richtung (Für die vollständige Primerliste siehe Material und Methoden):

```

ATGAGGATTGAAGTCACTCAGACGACGACTGTTCCGCCGGAGACTCCGACAGAGCCTCAGATCTTGTC
CTGCTCGGCCTGTGATCTCTTCGCGCGCCCCATTCACGTTCCGACTGTGTATTTCTTTGGAGAGCAAT
CTCCAGGAGCGAATGACGATGTTGTTCCCAAGCTGAAGGAATCCCTTGCGAAGCTCCTGGTCACATTT
TATGCGGTAGCGGGAAGGGTGAACGGAAGTCCCCGGGGGACATGAGCTTGTAATTGACTGCAACGA
CGCAGGTGTGGAGTTCATAGAAGCGGTTGCCGACGGACCTTTGTCTGAGCTTGGAGAGTTCCGCCCTA
ACCCCATTTTTCGATTTGTTGGCTCCCAAGCCTGACACTTCCCTCCCTCTTGAGGACAATGCCATCCTA
TATGTGCAGATCACTAAGTTCACATGCGGTGGATTCTGCTTCGGTCTTGCTAATCATCATACTCTATC
CGATGGGATTTTCAGCTCACAACCTTTTCATCTCTTGGAAGTGCAGAGGCTGAGAGATCTCGG
TCCTTCCCAACTTCAACCATTTCGTTGCTTACAGGTGCTGGGACTCCTGTTCCCTGAGAAGCAGCCGGAG
ATGCTGAAGCTGAGGCCACAGGTCCTCCGCCTCCCATGTGCGACGAGGAAAACAAAGGAAGGTTTGT
TACCTTCACCCAGAAATGATAAAGAAAGTGAAAGCGAGAGCTATCGGCGATGGTGCCTAGGATCCT
TTACCACATTTCGAGAGTCTGTCTGCTCACACATGGAGAGCAGTTGTCCGAGCGAAGAATCTGAGCCCA
ACAGAAGAGGCAAGGTTCTTCACTACATTGGATAGCAGGAAGAGGCTAAAGCCGAATCTGCCAGACGG
TTATTATGGGAACGGGATAATGTTTACTTATAAAGAAGCGACTGTAGGAGATGTCCTGACCAAACCGC
TGTCGTTCTCTGCTACCCTAGTTTCGTGAAGCTGTGGCAAAAATGACCAGTGAGCGCATCAAGGAGGCT
ATTGCGTGGGCAGAACCCCAAACCTTCTGGAGTTATGGTGGCCATCAACACTATGGGGAACGATGTCTC
CTCTGCTGCATGGTTTCGGATGCCCTTCTTCGATACGGATTTTGGGTATGGCAAGCCGTTGTTTGCTG
GCCCTGCAGACAACCCCTACAATGGTTGTATTTTATGCTTCCGGCACCGCAGCCCATGGCTATCAAT
GTCTTTATTTGCCTGTGGGAGGATGATATGGAAAGGTTGGAAAGTGACGAGGAGTTCTCCTCGTCAA
CTGA

```

#### Translatierte Aminosäuresequenz der AaHCT2:

```

MRIEVTQTTTVPETPTEPQILSCSACDLFARPIHVRTVYFFGEQSPGANDDVVPKLKESLAKLLVTF
YAVAGRVRKRVPGGHELVIDCNDAGVEFIEAVADGPLSELGEFRPNPIFDLLAPKPDTSPLPLEDNAIL
YVQITKFTCGGFCFGLANHHTLS1DGISAHNLFISWTEVARGLEISVLPNPNHSLLTGAGTPVPEKQPE
MLKL RPTGPPPMSTRKTK EGLFTFTPEMIKKVKARAIGDGALGSFTTFESLSAHTWRVVRANKLSP
TEEARFFTTLD2SRKRLKPNLPDGYYGNGIMFTYKEATVGDVLT3KPLSFSATLVREAVAKMTSERIKEA
IAWAEAQTSGVMVAINTMGNDVSSAAWFRMPFFD4TDFGYGKPLFAGPADNPYNGCILMLPAPQPM5AIN
VFICLWEDDMERLESDEEFLLVN-

```



Beide konservierte Bereiche sind vorhanden (unterstrichen), das HXXXDG Motiv genauso wie das DFGWG Motiv, das hier eine leichte Änderung aufweist. St. Pierre und De Luca (2000) beschreiben die vierte Aminosäure im DFGWG Motiv als Tryptophan, mit der Möglichkeit, dass auch Tyrosin, Phenylalanin, Methionin oder Leucin vorkommen können. AaHCT2 ist die erste BAHD-Acyltransferase aus Moosen, die heterolog in *E. coli* exprimiert wurde. Das Sequenzalignment mit Proteinen der Datenbank ergab die höchste Übereinstimmung der HCT 2 mit unspezifizierten Proteinen aus dem Laubmoos *Physcomitella patens* (XP\_001785388.1, 59% Identität, entspricht Pp1s465\_28V6.1 der cossmoss-Datenbank und der Sequenz PpHCT4 in dieser Arbeit) sowie 34% mit der Sequenz CDG56249.1, der HST-2 aus *Glechoma hederacea*, deren Enzymaktivität nachgewiesen wurde (Sander 2010).

Die korrespondierende Sequenz von Dr. Szóvényi trägt die Nummer 27056. Das Alignment liefert eine 100%ige Übereinstimmung:

```
HCT_2      MRIEVTQTTTVPETPTEPQILSCSACDLFARPIHVRTVYFFGEQSPGANDDVVPKLKES
27056      MRIEVTQTTTVPETPTEPQILSCSACDLFARPIHVRTVYFFGEQSPGANDDVVPKLKES
          *****

HCT_2      LAKLLVTFYAVAGRVKRVPGGHVLDICNDAGVEFIEAVADGPLSELGEFRNPFI DLL
27056      LAKLLVTFYAVAGRVKRVPGGHVLDICNDAGVEFIEAVADGPLSELGEFRNPFI DLL
          *****

HCT_2      APKPDTSLPLEDNAILYVQITKFTCGGFCFGLANHHTLSDGISAHNLFISWTEVARGLEI
27056      APKPDTSLPLEDNAILYVQITKFTCGGFCFGLANHHTLSDGISAHNLFISWTEVARGLEI
          *****

HCT_2      SVLPNPNHSLLTGAGTPVPEKQPEMLKLRPTGPPPPMSTRKTKEGLFTFTPEMIKKVKAR
27056      SVLPNPNHSLLTGAGTPVPEKQPEMLKLRPTGPPPPMSTRKTKEGLFTFTPEMIKKVKAR
          *****

HCT_2      AIGDGALGSFTTFESLSAHTWRAVVRAKNLSPTEEARFFTTLDSRKRLKPNLPDGYGNG
27056      AIGDGALGSFTTFESLSAHTWRAVVRAKNLSPTEEARFFTTLDSRKRLKPNLPDGYGNG
          *****

HCT_2      IMFTYKEATVGDVLT KPLSFSATLVREAVAKMTSERIKEAIAWAEAQTSGVMVAINTMGN
27056      IMFTYKEATVGDVLT KPLSFSATLVREAVAKMTSERIKEAIAWAEAQTSGVMVAINTMGN
          *****

HCT_2      DVSSAAWFRMPFFD TDFGYGKPLFAGPADNPYNGCILMLPAPQPM INVFICLWEDDMER
27056      DVSSAAWFRMPFFD TDFGYGKPLFAGPADNPYNGCILMLPAPQPM INVFICLWEDDMER
          *****

HCT_2      LESDEEFLLVN
27056      LESDEEFLLVN
          *****
```

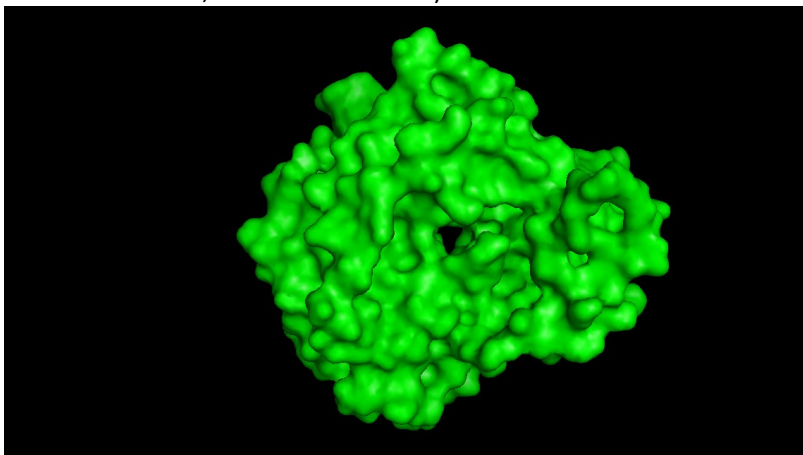
#### (1) Strukturvorhersage für AaHCT2

Ein Alignment mit der AaHCT2 mit der SbHST zeigt ein anderes Bild als bei der HCT 1 (Abb. 47):

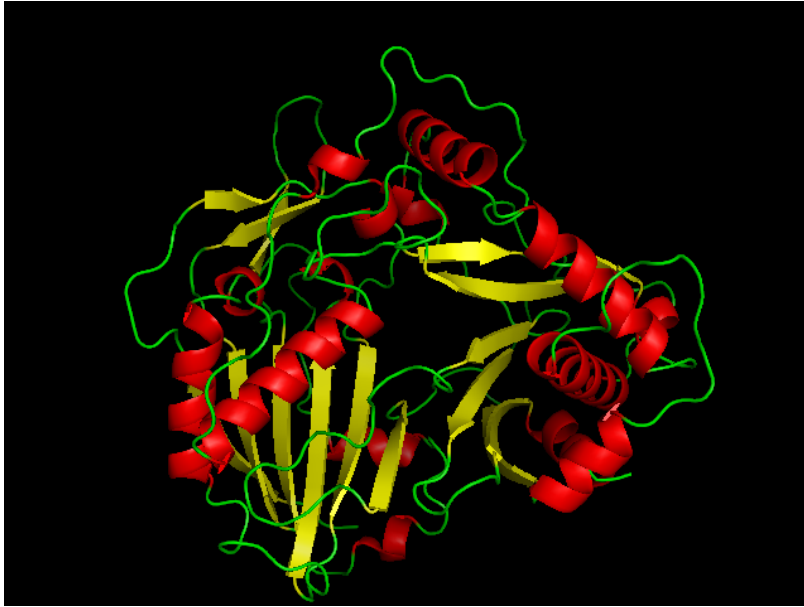
Model_01	MRIEVTQTTTVRPETPTPEQILSCSACDLFARPIHVRTVYFFGEQSPG-----ANDDVVPKLKESLAKLLVT	67
4ke4.1	AMKI TVRGSENVYPAAEPTPRRLWNSGPDLVVPRFHTPSVYFFRRDADGNLTAADGSFFDGARMRRALAAHLVP	75
Model_01	FYAVAGRVRKRVPGGHELVIDCNDAGVEFIEAVA-DGPLSELGEFRPNPIFDLLAPKPDTSPLFLEDNAILYVQIT	141
4ke4.1	AFYPMAGRLARDEDG--RVRIDCNAAGVLFQEAADPDATIDYFGDFAPTMELEKRLIPTVDFSD-DTAEPLLVLOVT	147
Model_01	KFTCGGFCFGLANHHTLSDGISAHNLFISWTEVARGLEISVLPNFNHSLLTGAGTPVPEKQPEMLKLRPTG-P--	213
4ke4.1	HEKCGGVAIGVGMQHHVADGESGLHFINSWADLCRGVPIAVMPIDRSLLRARDPPAPVYPHVEYQPAPAMLSSE	222
Model_01	-----PPFMSTRKTKEGLFTFTPEMIKKVKAR--AIGDGALGSFTTFESLSAHTWRRAVVRANKLSPTEEARFF	279
4ke4.1	APPQAALTAKPAT-PPAAVAIFKLSRAELGRLRSQVPAREREGAPRFSTYAVLAAHVWRCASLARGLPADQFTKLY	296
Model_01	FTLDSRKRLKPNLPDGYYGNGIMFTYKEATVGDVLTKEPLSFSATLVREAVAKMTSERIKEAIAWAEAQTSGVMVA	354
4ke4.1	CATDGRQRLQPPLEPGIFGNVLETAETPLADAGTV-TAGVAEGAAVIQAAALDRMDGGYCRSALDYLELPDLSALV	370
Model_01	I--NT-MGNDVSSAAWFRMPFFDTFDFGYGKPLFAGPADNPYNGCILMLPAPQ-FMAINVFICLWEDDMERLESDE	425
4ke4.1	ARGAHTERCENLGLTSWVRLPIHDADEFGWGRPVFMGPGGIAYEGLAFVLEPSANRDGSLSVASISLQSEHMEKFKLI	445
Model_01	EFLLVN	431
4ke4.1	AYD----	447

**Abbildung 47** Sekundärstrukturalignment von HCT 2 auf der Basis der bekannten Struktur der HST aus *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013). Pfeile = Faltblätter, Quadrate = Schleifen, rot = schlechte Qualität, blau = gute Qualität.

Weite Teile der Sequenz sind blau dargestellt, was auf eine passende Vorhersage der Struktur hinweist. Das resultierende 3D-Modell wurde mit Hilfe von PyMol erstellt (Abb. 48-50). Eindeutig ist in den Abbildungen 48 und 49 die torusförmige Struktur des Enzyms zu erkennen, die ein Eindringen der beiden Substrate (Akzeptor und Donor) von beiden Seiten her erlauben, so dass sie sich in der katalytischen Umgebung treffen (Abb. 50) Diese wird von Histidin 156 dominiert (Ma et al. 2005; Unno et al. 2007; Walker et al. 2013).



**Abbildung 48** Oberflächenmodell der HCT 2 auf Basis der bekannten HST aus *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013). Die Oberfläche von SbHST besitzt viele hydrophile Reste und das Enzym ist gut löslich.



**Abbildung 49** Proteinstrukturmodell der HCT 2 auf Basis der bekannten HST aus *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013). Rot = Helices, gelb = Faltblätter, grün = Schleifen.

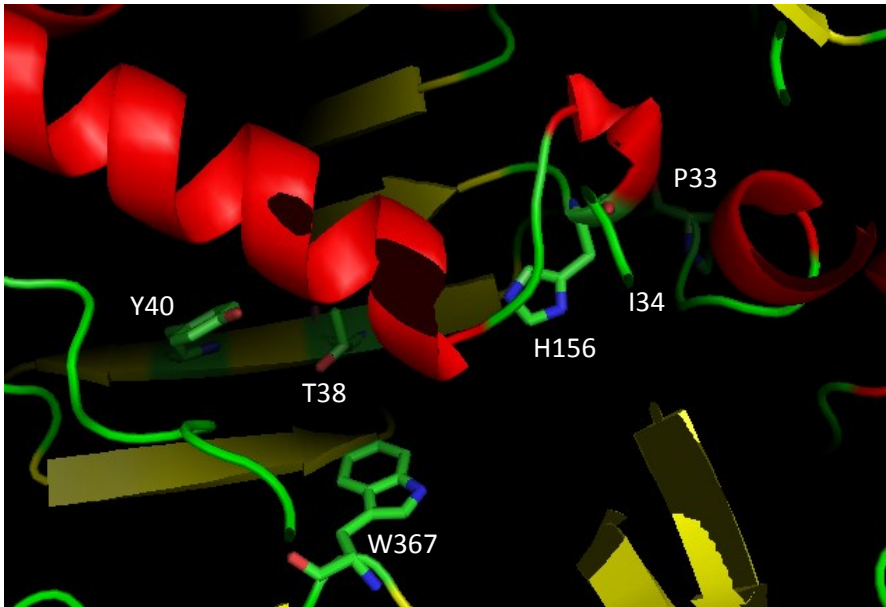


Abbildung 50 Katalytische Aminosäuren der HCT 2 auf Basis der bekannten HST aus *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013). Rot = Helix, gelb = Faltblatt, grün = Schleifen, herausgehoben sind die Aminosäuren P33, I34, T38, Y40, H156 und W367.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wird angenommen, dass die HCT 2 aus *Anthoceros* ein Kandidatengen für die RAS oder eine HST-Aktivität sein wird.

**c) HCT 3**

HCT 3 wurde im Zuge der Vollängenamplifizierung von HCT 2 gefunden. Die Sequenz liegt nicht als Volllänge vor, die zweite Hälfte mit dem 3'-Ende fehlt. Bisher sind 510 bp bekannt.

cdNA-Sequenz der AaHCT3, unterstrichen sind die genspezifischen Primer mit 5'→3' Richtung (Für die vollständige Primerliste siehe Material und Methoden):

ATGAGGATTGAAATCGCTCGGACGACGACTGTTCTGGCCGGATACTCCACGGACCGTCCGATCTTGTC

CTGCTCGGCCTGTGATCTCTTCGCGCGCCCCGTTCAATTTCTGACTGAGTATTTCTTTGGAGAGCATG  
CTCCTGTAGCGAATGACCATGTTGTTCCCCCTTGTGAAGGACTCGCTTGCGAATCTCCTGGTCACATTT

TATGCGGTACCGAGAAGGGTGAACGAAATGTCCCCGGGGGACATGGCCTTGTAATTGACTGCGACGA  
 CGCAGGTGTGGATGTCATAGAACCGGTTGCCGACGGAGCTTTGTCTGACCTTGGAGAGTTCCGCCCTA  
 ACCCCATTTTCGATTTGGTGGCTCCCTCCCTGACGCTTCCCTCGCTCTTGAGGACGATGCCATCCTA  
 TATGTGCAGATCACTGAATTCACATGCGGTGGAGTCTGCTTCGGTCTTGCTAATCATCATACTCTATC  
 TCATGGGATTTCCGCTCACTGCCTTGTCGTCTCT

Translatierte Aminosäuresequenz von AaHCT3, konservierte Bereiche sind unterstrichen:

MRIEIARTTTVRPDTPTDRPILSCSACDLFARPVHFLTEYFFGEHAPVANDHVPLVKDSLALLVTF  
 YAVPRRVKRNVPGGHGLVIDCDDAGVDVIEPVADGALS<sup>DL</sup>GEFRNP<sup>IF</sup>DLVAPLPDASLALEDDAIL  
 YVQITEFTCGGVCFGLAN<sup>HHTLS</sup>HGISAHCLVVS

Das HXXXDG weist erneut eine Änderung im Vergleich zu den bisher beschriebenen Sequenzen auf: Das Aspartat, welches hoch konserviert ist, liegt hier als Histidin vor. Ob und welche Auswirkungen dies auf die Katalyse hat, kann erst untersucht werden, wenn die Sequenz vollständig amplifiziert und exprimiert worden ist. Obwohl es sich nicht um die katalytisch entscheidende Aminosäure handelt, muss dabei bedacht werden, dass eine räumliche Nähe zweier Aminosäurereste in einem ( $\alpha$ -Helix)-Peptid durch die Diederwinkel und durch die Sekundärstruktur erst jede dritte bis vierte Aminosäure gegeben ist.

Das Proteinalignment mit HCT 2 zeigt eine hohe Übereinstimmung in der bekannten Sequenz. Eine RACE-PCR mit genspezifischen Primern gestaltet sich dadurch schwierig, da gleichzeitig zur HCT 3 auch die HCT 2 vervielfältigt werden kann.

HCT2	MRIEVTQTTTVRPETPTEPQILSCSACDLFARPIHVRTVYFFGEQSPGANDDVVPKLKES
HCT3	MRIEIARTTTVRPDTPTDRPILSCSACDLFARPVHFLTEYFFGEHAPVANDHVPLVKDS ****       *****   *       *****       *   *       *       *       *   *
HCT2	LAKLLVTFYAVAGRVKRKVPGGHELVIDCNDAGVEFIEAVADGPLSELGEFRNP <sup>IF</sup> DLL
HCT3	LANLLVTFYAVPRRVKRNVPGGHGLVIDCDDAGVDVIEPVADGALS <sup>DL</sup> GEFRNP <sup>IF</sup> DLV **       *****       *       *****       *       *       *       *****       *
HCT2	APKPDTS <sup>L</sup> PLEDNAILYVQITKFTCGGFCFGLAN <sup>HHTLS</sup> DGISAHN <sup>L</sup> FISWTEVARGLEI
HCT3	APLPDASLALEDDAILYVQITEFTCGGVCFGLAN <sup>HHTLS</sup> HGISAHCLVVS----- **   *   *   *   *       *****       *       *****       *       *       *
HCT2	SVLPNFNHSLLTGAGTPVPEKQPEMLKLRPTGPPPPMSTRKTKEGLFTFTPEMIKKVKAR
HCT3	-----
HCT2	AIGDGALGSFTTFESLSAHTWRAVVRAKNLSPTEEARFFTTLDSRKRLKPNLPDGYYGNG
HCT3	-----
HCT2	IMFTYKEATVGDVLTKPLSFSATLVREAVAKMTSERIKEAIAWAEAQTSGVMVAINTMGN
HCT3	-----
HCT2	DVSSAAWFRMPFFD <sup>T</sup> DFGYGKPLFAGPADNPYNGCILMLPAPQPM <sup>A</sup> INVFICLWEDDMER
HCT3	-----
HCT2	LESDEEFLLVN
HCT3	-----

#### d) HCT 4

Die vierte HCT ist erstaunlicherweise im Zuge der PCR mit Vollängenprimern der PAL gefunden worden. Die Sequenz ist unvollständig, da sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende fehlen, allerdings ist ein Intron (fett) vorhanden, obwohl cDNA als Templat verwendet wurde. Bei diesem Intron handelt es sich nach Kalkulationen des NetPlantGene Servers um ein Q-Intron, welches bei HCTs häufig vorkommt, benannt nach der Aminosäure, die vom letzten Codon vor der Splicingstelle (in Phase 0) codiert wird.

Partielle gDNA-Sequenz der AaHCT4:

```
GTGTTAGTTACTTTTTATCCGATGGCCGGACGATTGAAACGAGACGATGATGGTCGCGTCGAGATTGA
TTGTAATGGAGAAGGCGTGCTCTTTGTTGAGGCTGAGTCTGATGGAGTGGTGGATGATTTTGGTGACT
TTGCACCCACGTTAGAGCTCCGTCAACTTATTCCGACTGTTGATTATTCACCTGGGATATCCTCGTAC
TCATTGTTGGTTTTGCAGGTGAGTTTCCCTTATTTTTTTGCTATTTTTTTTTATGTCGAAAAATTGTT
ATTTAGAGTGCAAGTATATCAAGATTAAGGAGGTAATCTTATTTGCAAATGAGCCACAAAGACGGTA
CAAATTATAAATGGGAGGGAAATTGAACCTGTGACTTATCGTACACAAGACCTCAGTCTTCGCCACCA
GACTAGATACTCATCGTTTTCATGTACCTTTTATGGCTGGGTAAATCAATGTCCTTAAATGAACCTCA
TTCCGTAACCTCATCCGAAGAATGCGATATGCGAATAATAGATTTCTTGATTCAAGAAAGTTTATTTA
AGTAATACTGTTTAACTAATAACATTCTTAGTATTGTCATATATTAGATTTGATTCTTATCGTT
TGATTGTAATTTCTTTTGTGCGTCCAAAATTAATTTTTTTTACTAGAAGTAGGAGATTCTCGAATTC
AGATATAACAGCTAAATTTGATGACAAGACACCAAGACAGTACTAGTTGGATAAATTTTAGTTTATGA
ATGCTGTTTATAATCTACTTATATATCCACGTAACCAGAAGAGAGATTTAATATGTAACCTGTTTTTT
ATGATTGCAGATCACCTTTTTTCAAATGTGGTGGAGTCTCACTAGGTGTTGGTATGCAACACCATGCTG
CAGATGGAGCCTCTGGACTGCATTTTATTAAACACATGGTCCGATATGGCTCGCGGTCTTGGTCTCACC
CTCGCACCATTCATAGACCGCACCTTCCTCCGTGCTCGTGAGCCGCCTCAACCTGCATTTCCCCACAT
TGAATACCAACCCCTCCTTCAATGAAATCCAACCCTGATCCGACAATTATTCCTGAAACATCCGTCT
CAATCTTCAAATTAATCTCGAGAGCAACTCAATGCTCTCAAAGCCAAGTCTAAGGAAGATGGAAACACC
GTGGCATATAGCTCCTATGAAATGCTGGCAGGACATATGTGGCGGTCTGTGTGCAAAGCCCGTGGACT
TCCCGATGATCAAGAAAGCAAATTGTACATCGCAACTGATGGAAGGTTTAGGTTACTTCTCTCACTCC
CACCAGGTTACTTTGGCAATGTAATTTTCACTACCACGCCTATAGCTGCAGCAGGTGATCTCATATCA
AAGCCACTGTGGTATAGCGCTAGTAGAATTCATGATGCATTGGCACGGATGGACAATGATTATCTAAG
GTCAGCTCTTGATTACCTGGAATTGCAGCCTGATCTTAAAGCACTTGTTTCGCGGAGCACATTCTTTCA
AGTGCCCCAACCTTGGAATTACTAGCTGGGCTAGATTGCCTATACATGACGCTGATTTCTGGGTGGGGT
AG
```

Somit sind 962 bp der codierenden Sequenz bekannt.

cDNA-Sequenz der AaHCT4, unterstrichen sind die genspezifischen Primer mit 5'→3' Richtung (Für die vollständige Primerliste siehe Material und Methoden):

```
GTGTTAGTTACTTTTTATCCGATGGCCGGACGATTGAAACGAGACGATGATGGTCGCGTCGAGATTGA
      ────────────────────────────────────────────────────────────────────────────>
TTGTAATGGAGAAGGCGTGCTCTTTGTTGAGGCTGAGTCTGATGGAGTGGTGGATGATTTTGGTGACT
TTGCACCCACGTTAGAGCTCCGTCAACTTATTCCGACTGTTGATTATTCACCTGGGATATCCTCGTAC
TCATTGTTGGTTTTGCAGATCACCTTTTTCAAATGTGGTGGAGTCTCACTAGGTGTTGGTATGCAACA
CCATGCTGCAGATGGAGCCTCTGGACTGCATTTTATTAAACACATGGTCCGATATGGCTCGCGGTCTTG
GTCTCACCTCTGCACCATTCATAGACCGCACCTTCCTCCGTGCTCGTGAGCCGCCTCAACCTGCATTT
CCCCACATTGAATACCAACCCCTCCTTCAATGAAATCCAACCCTGATCCGACAATTATTCCTGAAAC
ATCCGTCTCAATCTTCAAATTAATCTCGAGAGCAACTCAATGCTCTCAAAGCCAAGTCTAAGGAAGATG
GAAACACCGTGGCATATAGCTCCTATGAAATGCTGGCAGGACATATGTGGCGGTCTGTGTGCAAAGCC
CGTGGACTTCCCGATGATCAAGAAAGCAAATTGTACATCGCAACTGATGGAAGGTTTAGGTTACTTCC
```

TCCACTCCCACCAGGTTACTTTGGCAATGTAATTTTCACTACCACGCCTATAGCTGCAGCAGGTGATC  
 TCATATCAAAGCCACTGTGGTATAGCGCTAGTAGAATTCATGATGCATTGGCACGGATGGACAATGAT  
 TATCTAAGGTCAGCTCTTGATTACCTGGAATTGCAGCCTGATCTTAAAGCACTTGTTCGCGGAGCACA  
 TTCTTTCAAGTGCCCCAACCTTGGAATTACTAGCTGGGCTAGATTGCCTATACATGACGCTGATTTCCG  
 GGTGGGGTAG ←

Translatierte Aminosäuresequenz von AaHCT4, konservierte Bereiche sind unterstrichen:

VLVTFYPMAGRLKRDDDGRVEIDCNGEGVLFVEAESDGVVDDFGDFAPTLELRQLIPTVDYSLGISSY  
 SLLVLQITFFKCGGVSLGVGMQHHAADGASGLHFINTWSDMARGLGTLAPFIDRTLRLRAREPPQPAF  
 PHIEYQPPPSMKSNPDPTIIPETSVSIFKITREQLNALKAKSKEDGNTVAYSSYEMLAGHMWRSVCKA  
 RGLPDDQESKLYIATDGRFRLPLPPGYFGNVIFTTTPIAAAGDLISKPLWYSASRIHDALARMNDND  
 YLRSALDYLELQPDLLKALVRGAHSFKCPNLGITSWARLPIHDADFGWG

Die konservierten Bereiche sind erhalten. Mit den Sequenzen aus der Schweiz wurden keine Übereinstimmungen gefunden. Ein Alignment mit Proteinen aus der Proteindatenbank ergab eine hohe Übereinstimmung (84-87%) mit HCTs bzw. HCS/QTs aus *Daucus carota*, *Platycodon grandiflorus* und *Nicotiana spec.* Die Sequenz AAZ80046.1, eine HCS/QT aus Artischocken, deren Enzymaktivität nachgewiesen wurde (Comino et al. 2007) zeigt eine 83%ige Identität. Gerade wegen dieser Indizien kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Sequenz durch Kreuzkontamination durch Arbeiten mit anderen Pflanzen im Labor gefunden wurde und es sich nicht um eine HCT aus *Anthoceros* handelt.

#### e) HCT 5

Bei der HCT 5 handelt es sich um die Sequenz 20729 der Daten von Dr. Szövényi. Die Sequenz wurde mit Volllängenprimern vervielfältigt. Da das Schlusscodon fehlte, wurde dieses noch angefügt.

Die erhaltene Sequenz ist 1464 bp (Abb. 51-53) sowie 487 Aminosäuren lang, das Molekulargewicht beträgt 54,2 kDa.

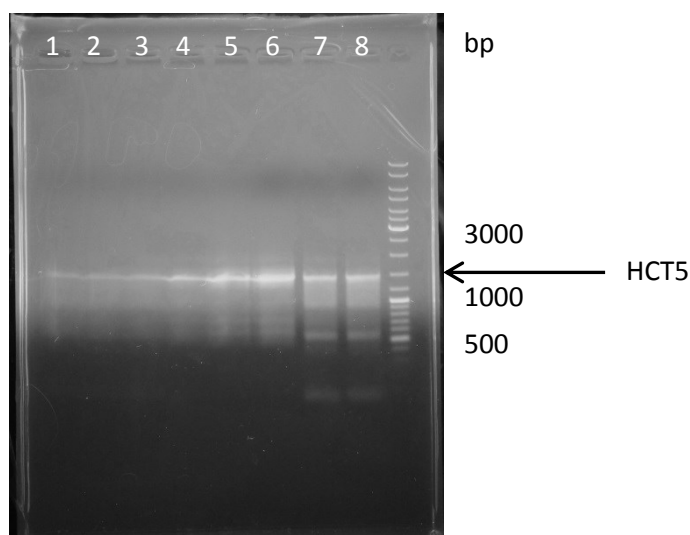


Abbildung 51 PCR von AaHCT5 mit Volllängenprimern AaHCT5-VLf und AaHCT5-VLr (Konzentration der Primerlösung 100  $\mu$ M), Temperatur 58 °C (Geltaschen 1-8), erwartet 1464 bp, erhalten ~1500 bp (Geltaschen auf der linken Seite waren beim Beladen gerissen).

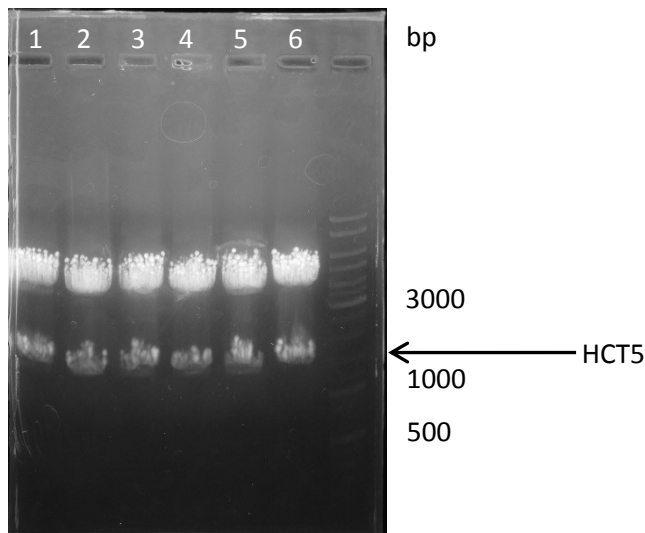


Abbildung 52 Doppelverdau von pDrive[AaHCT5] mit NdeI und XhoI, *E. coli* Klone 1-6.

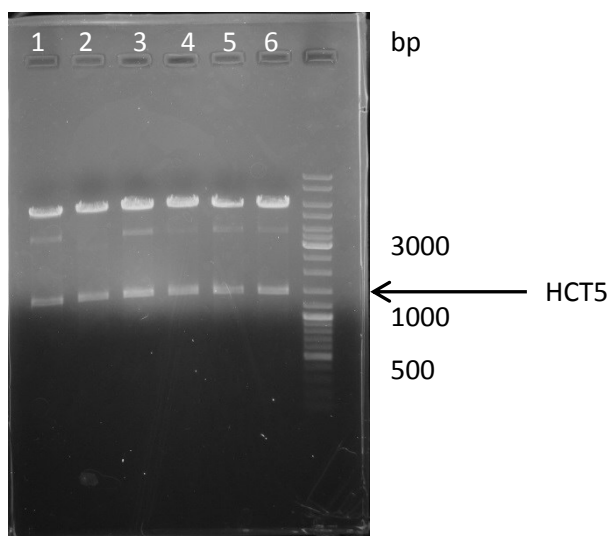


Abbildung 53 Doppelverdau von pET-15b[AaHCT5] mit NdeI und XhoI, *E. coli* Klone 1-6.

#### cDNA-Sequenz der AaHCT5:

```

ATGACGCGCATCAACTACTTCGCGGAGCCATCAGAATCGGAGGCCAATGCGCTCCGTTTCACACACCG
GGAGATGTGTTACATTGCGCCAGAGAAGCCGTCTGAGGTTGAGCAGATTCCCTCTACCAATCTCGACC
TGCTGATGCCAGAGATGTGGGTGCCGGTCGTCTTCTTTCGCGAACAGAGCGCAAAC TGCCGAGAAG
TTCCAAGAGCTGGTGCAGCAGCTCAAGAGCTCGCTGGCCAAGGTGTTGGTCCCCTTCTATCCCATGGC
CGGGCGAATTGTGTACCCTGACTCCAGTGCCGAACGCCCGCACTTTTTGTGCAACGACGAAGGAGTGC
CGTTCACGGAAGCCTGGATCGATGCCGAGATGAAGGATTTCTTCGGAGACGAAAAC TTCAAGCCTCAG
CCGCAGCTGTCTGGGGATGAAGGCGGTTCTGGACAAC TACAATCCGCGCAACGCGCCTGCTGTTGCCAT
CCAGGTGACCTACTTCCAGAAGTGCGGGGGAGTGGCAGTGCAGGTCAC TTGGAGCCACACGGCGGCTG
ACGGCTTCTCCGGATTCCATTTCTTCCGGTCCTGGGCGGAGATGACGCGGAAGGGAGACATCTCCCTG
GCTCCGGATCACCGCAGGGAGCTCTTCCATCCCCGAAACCCTCCCAAGTTCGATGACTCTCTGACGGG
AGTGCGCATTGCTCCAGGCAACGAGAACTTCCACGAGCTCGGAAACCTAGCTTTGTGCTTGTTTCCCG
TTGCGAGGGAACAAACGCAGAAGATCAAGGAGGAAGCAGTGTCCGCCATAGCCC GGAACGGGGAAGCA
TCATCGGAGAAACCTTCCC GCCGTATCTGACTACGGCTGATTGTATGTCCGCTTACATCTGGCAGAG
CATCATCCAAGCGCGCGGCTTG GATGCCAAGCACAAAGGTGCGCTTCATGACCTTCGTGGACGGTAGAA
AGCGGTTTCTGCCATCGCCAGAGGATGCTTCCTCATCGCTGCCACACAATGCGTACTTCGGGAACTTC
GTGTGCTTTGCCGGTGCAACCACCACGGCCGGAGCTCTGCTCTCCAAGCCACTCGCTTTCTCGGCAGC

```

TCTGATCCACGAAGCCGTGTCCTCAGTCAGCAGCATTGAGCGGTACCGCGCAACCATTGATTTCTCGG  
AAGCCCATGGAAGACACCGGGTGGTGATCGGGAACAAGGATAGCATTAGCTTCAGCAACGGGGAAGAA  
GGAGACTGGGTTTCTGAGTGCATTTCTCCTGGTGGAGTCCTGGGTTTGTGATCTACGGCCTCGATTT  
CGGCTGGGGCCCTCCCGACTTTGGAGCAAGAAATGGCATTCTTCCAGTCGAGTTTGTGGTGCATTCA  
ATGTCATTCTAGCAACACGGCCCCAGGGGACGTCACCGTGTATTATGTCTCTTGAAAACGAGACAATG  
CCAAACTTTTCAGGCAAGCTTTCTCAGGTCTTATTGA

#### Translatierte Aminosäuresequenz von AaHCT5:

MTRINYFAEPSESEANALRFTHREMCYIAPEKPSEVEQIPLTNLDLLMPBMWVPPVVLFFANRAQTAEK  
FQELVQQLKSSSLAKVLVPFYPMAGRIVYPDSSAERPHFLCNDEGVPFTEAWIDAEMKDFFGDENFKPQ  
PQLSGMKAVLDNYPNPNAPAVAIQVTFYQKCGGVAVQVTSHTAADGFSGFHFFRSWAEMTRKGDISL  
APDHRRELFHPRNPPKFDDSLTGVRIAPGNENFHELGNLALCLFPVAREQTQKIKEEAVSAIARNGEA  
SSEKPFPPYLTTADCMSAYIWQSI IQARGLDAKHKVRFMFTVDGRKRFLPSPEDASSSLPHNAYFGNF  
VCFAGATTTAGALLSKPLAFSAALIHEAVSSVSSIERYRATIDFSEAHGRHRVVIGNKDSISFSNGEE  
GDWVSECISWWSPPGFVIYGLDFGWGPPDFGARNGILPVEFAGAFNVIPSNTAPGDVTVFMSLENETM  
PNFQASFLRSY-

Die entscheidenden konservierten Bereiche (unterstrichen) sind vorhanden. Das Sequenzalignment mit Proteinen aus Datenbanken ergab die höchste Übereinstimmung der HCT 5 mit XP\_001762337.1 aus *Physcomitrella patens* (33%) sowie mit der HST aus der Gurke *Cucumis sativus* (NP\_001295843.1, 30%), die eine nachgewiesene Aktivität besitzt (Varbanova et al. 2011). Das Alignment mit der Sequenz 20729 zeigt eine kleine Veränderung auf, das Prolin 304 liegt bei HCT 5 als Alanin vor. Da sich die Codons von Alanin und Prolin nur an der ersten Position unterscheiden, kann es auch hier zu einer Punktmutation gekommen sein (Die PCR wurde allerdings mit einer High Fidelity-Polymerase durchgeführt). Jedoch ist eine Änderung von oder zu Prolin durch dessen starre Struktur meist mit erheblichen Struktur- und Konformationsänderungen im Protein verbunden. Ob diese auch hier zum Tragen kommen, kann nur durch ein Modell geklärt werden.

Alignment der AaHCT5-Aminosäuresequenz mit der translatierten Sequenz 20729 aus dem *Anthoceros agrestis* Genomprojekt (Dr. Péter Szövényi, persönliche Mitteilung):

HCT_5	MTRINYFAEPSESEANALRFTHREMCYIAPEKPSEVEQIPLTNLDLLMPBMWVPPVVLFFA
20729	MTRINYFAEPSESEANALRFTHREMCYIAPEKPSEVEQIPLTNLDLLMPBMWVPPVVLFFA
	*****
HCT_5	NRAQTAEKFQELVQQLKSSSLAKVLVPFYPMAGRIVYPDSSAERPHFLCNDEGVPFTEAWI
20729	NRAQTAEKFQELVQQLKSSSLAKVLVPFYPMAGRIVYPDSSAERPHFLCNDEGVPFTEAWI
	*****
HCT_5	DAEMKDFFGDENFKPQPQLSGMKAVLDNYPNPNAPAVAIQVTFYQKCGGVAVQVTSHTA
20729	DAEMKDFFGDENFKPQPQLSGMKAVLDNYPNPNAPAVAIQVTFYQKCGGVAVQVTSHTA
	*****
HCT_5	ADGFSGFHFFRSWAEMTRKGDISLAPDHRRELFHPRNPPKFDDSLTGVRIAPGNENFHEL
20729	ADGFSGFHFFRSWAEMTRKGDISLAPDHRRELFHPRNPPKFDDSLTGVRIAPGNENFHEL
	*****
HCT_5	GNLALCLFPVAREQTQKIKEEAVSAIARNGEASSEKPFPPYLTTADCMSAYIWQSI IQAR
20729	GNLALCLFPVAREQTQKIKEEAVSAIARNGEASSEKPFPPYLTTADCMSAYIWQSI IQAR
	*****
HCT_5	GLDAKHKVRFMFTVDGRKRFLPSPEDASSSLPHNAYFGNFVCFAGATTTAGALLSKPLAF
20729	GLDPKHKVRFMFTVDGRKRFLPSPEDASSSLPHNAYFGNFVCFAGATTTAGALLSKPLAF
	*** *****



```

HCT_5      SAALIHEAVSSVSSIERYRATIDFSEAHGRHRVVIGNKDSISFSNGEEGDWVSECISSWW
20729      SAALIHEAVSSVSSIERYRATIDFSEAHGRHRVVIGNKDSISFSNGEEGDWVSECISSWW
          *****

HCT_5      SPGFVIYGLDFGWGPPDFGARNGILPVEFAGAFNVIPSNTAPGDVTVFMSLENETMPNFQ
20729      SPGFVIYGLDFGWGPPDFGARNGILPVEFAGAFNVIPSNTAPGDVTVFMSLENETMPNFQ
          *****

HCT_5      ASFLRSY
20729      ASFLRSY
          *****

```

Interessanterweise gibt es in der *Anthoceros agrestis* Datenbank eine zweite Sequenz, 20730, die eine zusätzliche Sequenz von 180 bp enthält (fett). Dabei wird es sich höchst wahrscheinlich wieder um ein Q-Intron handeln, da sie hinter dem dazugehörigen Codon anfängt. Ansonsten sind 20729 und 20730 identisch.

Nukleotidsequenz 20730 aus dem *Anthoceros agrestis* Genomprojekt (Dr. Péter Szövényi, persönliche Mitteilung):

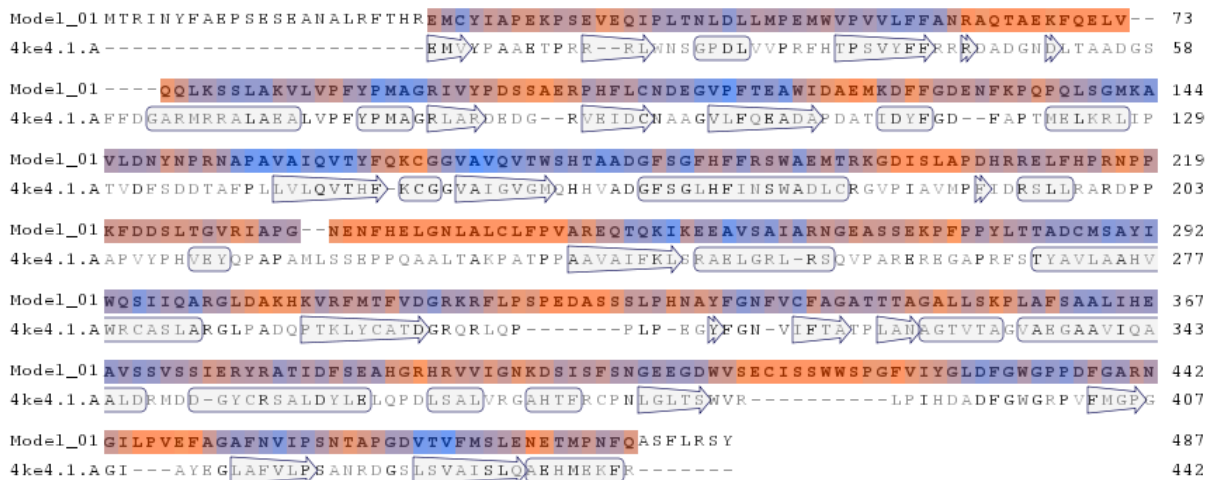
```

ATGACGCGCATCAACTACTTCGCGGAGCCATCAGAATCGGAGGCCAATGCGCTCCGTTTCACACACCG
GGAGATGTGTTACATTGCGCCAGAGAAGCCGTCTGAGGTTGAGCAGATTCTCTCACCAATCTCGACC
TGCTGATGCCAGAGATGTGGGTGCCGGTTCGTCTCTTCTTCGCGAACAGAGCGCAAACCTGCCGAGAAG
TTCCAAGAGCTGGTGCAGCAGCTCAAGAGCTCGCTGGCCAAGGTGTTGGTCCCCTTCTATCCCATGGC
CGGGCGAATTGTGTACCCTGACTCCAGTGCCGAACGCCCGCACTTTTTGTGCAACGACGAAGGAGTG
CGTTCACGGAAGCCTGGATCGATGCCGAGATGAAGGATTTCTTCGGAGACGAAAACCTTCAAGCCTCAG
CCGCAGCTGTCGGGGATGAAGGCGGTTCTGGACAACATAATCCGCGCAACGCGCCTGCTGTTGCCAT
CCAGGTGACTTTGAATGTTTGACATTTGCCCTACCTGCTGCCAGCTGCGTCCATGGCATCCAATTTG
TTCTCTCTCCAGCATCCAATTTGTTCTCTCCAGCATCCAATTTGTTCCCCCTCCAGCATCCAATTT
GTTCCCCCTTCAGCATTCCTTCCCTGACCTTGCGCGATGCTTCGCAGGTGACCTACTTCCAGAAGTG
CGGGGGAGTGGCAGTGCAGGTCACTTGGAGCCACACGGCGGCTGACGGCTTCTCCGGATTCCATTTCT
TCCGGTCTTGGGCCGAGATGACGCGGAAGGGAGACATCTCCCTGGCTCCGGATCACCGCAGGGAGCTC
TTCCATCCCCGAAACCTCCCAAGTTCGATGACTCTCTGACGGGAGTGCGCATTGCTCCAGGCAACGA
GAACTTCCACGAGCTCGGAAACCTAGCTTTGTGCTTGTTTCCCGTTGCGAGGGAACAAACGCAGAAGA
TCAAGGAGGAAGCAGTGTCCGCCATAGCCCGGAACGGGGAAGCATCATCGGAGAAACCTTCCCGCCG
TATCTGACTACGGCTGATTGTATGTCCGCTTACATCTGGCAGAGCATCATCCAAGCGCGCGGCTTGGA
TCCCAAGCACAAGGTGCGCTTCATGACCTTCGTGGACGGTAGAAAGCGGTTTCTGCCATCGCCAGAGG
ATGCTTCCTCATCGCTGCCACACAATGCGTACTTCGGGAACCTTCGTGTGCTTTGCCGGTGCAACCACC
ACGGCCGGAGCTCTGCTCTCCAAGCCACTCGCTTTCTCGGCAGCTCTGATCCACGAAGCCGTGTCTCTC
AGTCAGCAGCATTGAGCGGTACCGCGCAACCATTGATTTCTCGGAAGCCCATGGAAGACACCGGGTGG
TGATCGGGAACAAGGATAGCATTAGCTTCAGCAACGGGGAAGAAGGAGACTGGGTTTCTGAGTGCATT
TCCTCCTGGTGGAGTCCTGGGTTTGTGATCTACGGCCTCGATTTCCGGCTGGGGCCCTCCCGACTTTGG
AGCAAGAAATGGCATTCTTCCAGTCGAGTTTGTGTTGTCATTCAATGTCAATTCCTAGCAACACGGCCC
CAGGGGACGTCACCGTGTTTATGTCTCTTGAAAACGAGACAATGCCAAACTTTCAGGCAAGCTTTCTC
AGGTCTTAT

```

#### (1) Strukturvorhersage für AaHCT5

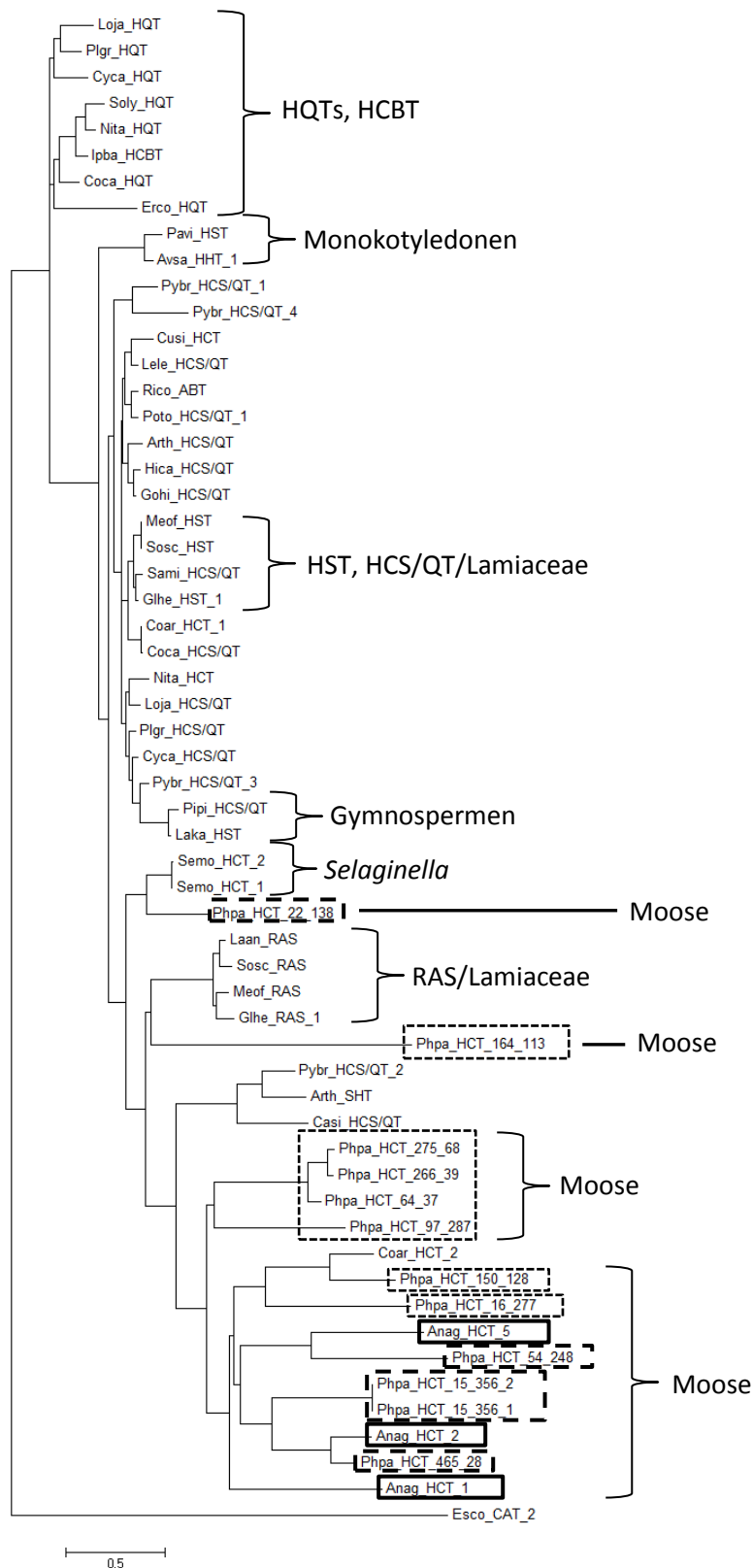
Das Sekundärstrukturalignment mit der SbHST zeigt ebenso wie bei der HCT 1 mehrere Stellen, an denen das Modell wenig Übereinstimmungen aufweist (Abb. 54). Die Aminosäuren, die hier rot repräsentiert werden, sind in Schleifen verteilt, mit Ausnahme des größeren roten Bereichs in der vorletzten Zeile (in SbHST durch die Aminosäuren WVR-LPIH dargestellt), die sich tatsächlich im Enzym befinden. Qualitativ ist das Model nicht so gut wie bei der HCT 2.



**Abbildung 54** Sekundärstrukturalignment von HCT 5 auf der Basis der bekannten Struktur der HST aus *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013). Pfeile = Faltblätter, Quadrate = Schleifen, rot = schlechte Qualität, blau = gute Qualität.

## f) Phylogenetische Einordnung der HCTs

Der phylogenetische Stammbaum wurde mit Vollhängensequenzen von 57 pflanzlichen HCTs mit einer Außengruppe der Chloramphenicol Acetyltransferase (ACT), einem vermuteten Vorläufer der BAHD-Acyltransferasen (Murray und Shaw 1997) aus *E. coli* erstellt (Abb. 55 und Tabelle 6). Schwarz durchgehende Linien geben die HCTs aus *Anthoceros agrestis* an, gestrichelte Linien die HCTs aus *Physcomitrella patens*, die für Expressionen in *E. coli* ausgewählt wurden, gepunktete (fein gestrichelte) Linien die übrigen HCTs aus *Physcomitrella*. Der Stammbaum lässt sich mit einigen wenigen Ausnahmen in zwei große Äste einteilen: Den ersten Ast bilden die HQTs (inklusive einer Hydroxycinnamoyl/Benzoyl-CoA:Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase HCBT), während auf dem zweiten Ast sämtliche andere Enzyme aufgeführt wurden. Dabei spielte es keine Rolle, ob diese bifunktionale HCS/QTs, HSTs, HCTs, RAS, ABTs (Anthranilat *N*-Benzoyltransferase), HHTs (Hydroxyanthranilat Hydroxycinnamoyltransferase) oder SHTs (Spermidin Hydroxycinnamoyltransferase) waren. Da viele Enzyme noch nicht charakterisiert sind, können unter dem Oberbegriff HCS/QT auch Enzyme aufgeführt werden, die eine andere HCT-Aktivität aufweisen. Weiterhin interessant ist, dass die HCTs aus Moosen und dem Moosfarn *Selaginella* einen Zweig dieses großen Astes besetzen, mit Ausnahme von vier HCTs sowie sämtlicher RAS Enzyme.



**Abbildung 55** Phylogenetischer Stammbaum der HCT. Dicke durchgehende Linien: *Anthoceros agrestis* HCTs, dicke gestrichelte Linien: Klonierte *Physcomitrella patens* HCTs, dünne gepunktete Linien: weitere *Physcomitrella patens* HCTs.

Escamilla-Treviño et al. erstellten einen phylogenetischen Baum von HCTs aus Monokotyledonen Pflanzen. Sie konnten zeigen, dass zwei HCTs aus der Rutenhirsen *Panicum virgatum* bevorzugt HST-Aktivität aufweisen, auch wenn die HQT-Reaktion katalysiert wird, während ein HCT-artiges Enzym

aus der gleichen Pflanze nur HQT-Aktivität aufweist. Da es phylogenetisch eine geringere Ähnlichkeit aufwies als die HCTs wurde es Pv-HCT-Like1 genannt (Escamilla-Treviño et al. 2014). Interessant ist dabei, dass die Monokotyledonen HCTs eine gemeinsame Klade gegenüber den Dikotyledonen bilden, und dass Pv-HCT-Like1 mit einigen weiteren nicht charakterisierten Enzymen aus Monokotyledonen einen eigenen Ast gegenüber den anderen HCTs besetzt. Ob diese weiteren Enzyme (größtenteils aus *Sorghum bicolor* und *Zea mays*) ebenfalls nur HQT-Aktivität aufweisen, ist nicht geklärt.

**Tabelle 6 Verzeichnis der für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaums verwendeten Proteinsequenzen von Acyltransferasen**

Abkürzung	Art	Accession number	Abkürzung	Art	Accession number
Anag	<i>Anthoceros agrestis</i>	HCT 1, 2, 5	Lele	<i>Leucaena leucocephala</i>	AGA20364.1
Arth	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179497.1 NP_199704.1	Loja	<i>Lonicera japonica</i>	AEK80405.1 AIG20957.1
Avsa	<i>Avena sativa</i>	AB076980.1	Meof	<i>Melissa officinalis</i>	FR670523.1
Casi	<i>Camellia sinensis</i>	JQ619537.1	Nita	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAE46932.1 CAD47830.1
Coar	<i>Coffea arabica</i>	CAT00082.1 ABO40491.1	Pavi	<i>Panicum virgatum</i>	KC696573.1
Coca	<i>Coffea canephora</i>	EF137954.1 EF153931.1	Phpa	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s150_128V6.1* Pp1s15_356V6.1* Pp1s15_356V6.2* Pp1s164_113V6.1* Pp1s16_277V6.1* Pp1s22_138V6.1* Pp1s266_39V6.3* Pp1s275_68V6.3* Pp1s465_28V6.1* Pp1s54_248V6.1* Pp1s64_37V6.1* Pp1s97_287V6.1* *Sequenznummer auf cosmos.org
Cusa	<i>Cucumis sativus</i>	JN005932.1	Pipi	<i>Pinus pinaster</i>	HE574565.1
Cyca	<i>Cynara cardunculus</i>	ACF37072.1 AFL93686.1	Plgr	<i>Platycodon grandiflorus</i>	AEM63675.1 AEM63676.1
Erco	<i>Erythroxylum coca</i>	JQ413187.1	Poto	<i>Populus tomentosa</i>	AFZ78608.1
Esco	<i>Escherichia coli</i>	X53796.1	Pybr	<i>Pyrus bretschneideri</i>	JQ280303.1 JQ280304.1 JQ280305.1 JQ280306.1
Glhe	<i>Glechoma hederacea</i>	HG423394.1 HG423392.1	Rico	<i>Ricinus communis</i>	XM_002512693.1
Gohi	<i>Gossypium hirsutum</i>	AHG97388.1	Sami	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	EU358958.1
Hica	<i>Hibiscus cannabinus</i>	JQ779021.1	Semo	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XM_002979015.1 XM_002991488.1

Ipba	<i>Ipomoea batatas</i>	BAA87043.1	Soly	<i>Solanum lycopersicum</i>	CAE46933.1
Laka	<i>Larix kaempferi</i>	KF515231.1	Sotu	<i>Solanum tuberosum</i>	HM010923.1
Laan	<i>Lavandula angustifolia</i>	AEA36976.1	Sosc	<i>Solenostemon scutellarioides</i>	A0PDV5.1 CBI83579.1

### 3. Tyrosin Aminotransferase (TAT)

Die degenerierten Primer für die TAT wurden wie bei der HCT und PAL mit Vollständigensequenzen aus höheren und niederen Landpflanzen (Samen- und Sporenpflanzen) erstellt, zusätzlich wurden Sequenzen aus anderen Reichen des Lebens etwa der Tiere verwendet. Alle Versuche, die TAT aus cDNA oder gDNA zu amplifizieren, blieben erfolglos. Da *Anthoceros agrestis* inzwischen sequenziert wurde (Szövényi et al. 2015), bietet es sich an, für diese und die restlichen Enzyme des Rosmarinsäurebiosynthesewegs die (noch partiellen) Sequenzen als Grundlage zur Erstellung von genspezifischen Primern zu verwenden und die Gene auf diese Weise, also über RACE-Methoden, zu amplifizieren.

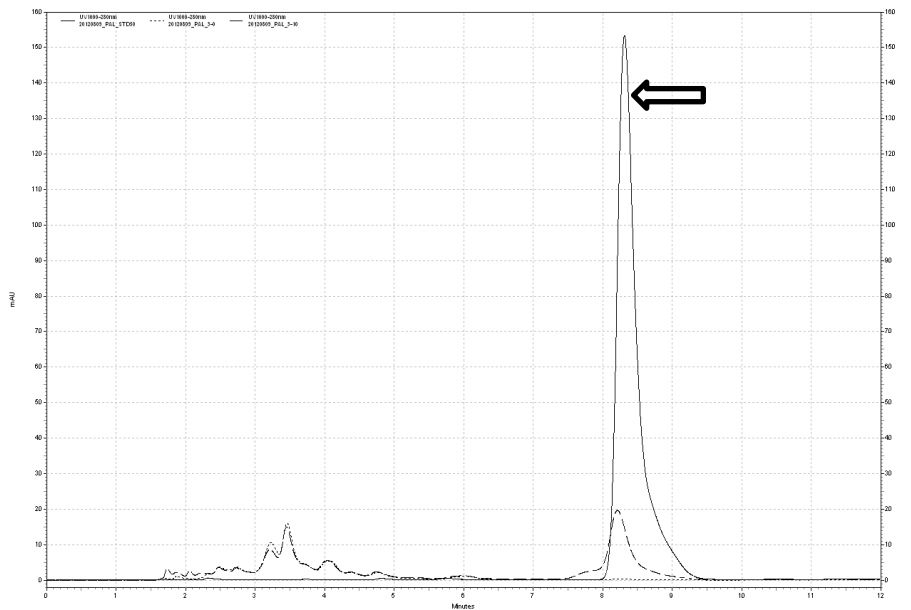
## C. Charakterisierung der Enzyme der Rosmarinsäurebiosynthese in *Anthoceros agrestis*

### 1. Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)

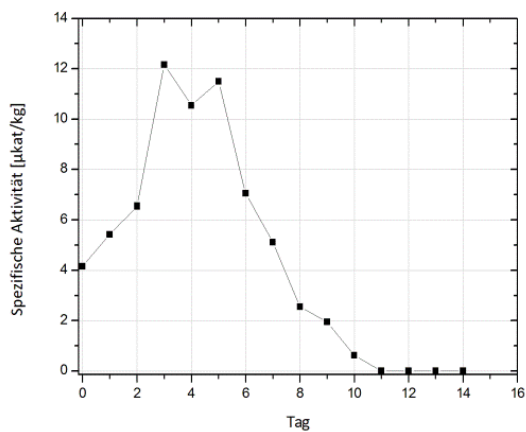
Die PAL ist ein Schlüsselenzym des Sekundärstoffwechsels aromatischer Verbindungen. Es verbindet die Aminosäure Phenylalanin aus dem Primärstoffwechsel über Zimtsäure mit dem Ausgangsstoff einer ganzen Reihe an Produkten aus dem Sekundärstoffwechsel, dem 4-Cumaroyl-CoA.

#### a) Enzymaktivität der PAL im Kulturverlauf

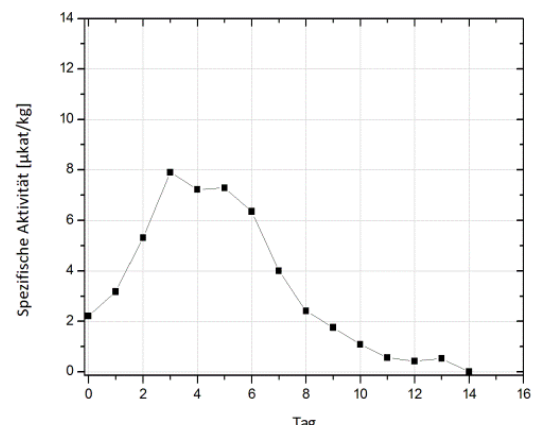
Im Kulturverlauf wurde die PAL-Aktivität in Proteinrohextrakten durch die Entstehung von *t*-Zimtsäure bestimmt (Abb. 56). Sie zeigt einen klaren Verlauf (Abb. 57-60). Mit einer Ausnahme, dem zweiten Kulturverlauf in CB-2 (Abb. 60), zeigten alle Werte ein Maximum zwischen dem 3. und 6. Tag des Verlaufs mit einer spezifischen Aktivität von 6  $\mu\text{kat/kg}$  in CB-2 bis 12  $\mu\text{kat/kg}$  in CB-M. Bei der eben erwähnten zweiten Charakterisierung in CB-2 war das Maximum um 3 Tage nach hinten verschoben, begann also erst am 6. Tag und dauerte bis zum 9., war aber in der Höhe vergleichbar. Auffällig ist auch, dass in allen Kulturverläufen die Aktivität gegen Ende auf kaum nachweisbare Werte abfällt. Besonders eindrücklich ist das im ersten Kulturverlauf in beiden Medien zu beobachten, wo die Aktivität ab dem 10./11. Kulturtag auf 0  $\mu\text{kat/kg}$  abfällt. Ein entscheidender Unterschied zwischen den Medien ist der Anfang. In CB-2 findet sich an Tag 0 noch eine starke spezifische Enzymaktivität, die dann rasch abfällt, bevor sie wieder auf das Maximum ansteigt. Im nährstoffarmen CB-M hingegen ist dieser primäre Abfall nicht zu beobachten.



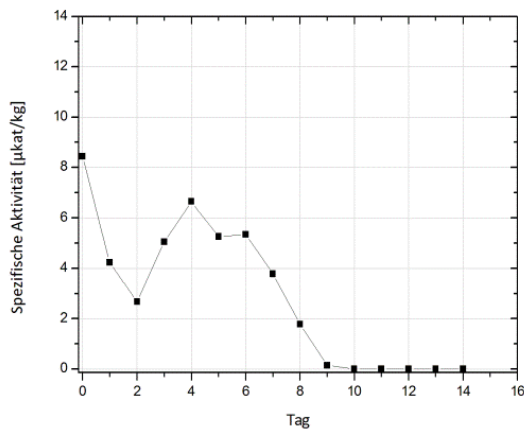
**Abbildung 56 HPLC-Chromatogramm eines PAL-Tests.** Durchgehende Linie = Zimtsäure-Standard, gestrichelte Linie = 10 Minuten Inkubation, gepunktete Linie = Kontrolle (0 Minuten Inkubation). Der gestrichelte Peak unterhalb des Standardpeaks (Pfeil) ist das Produkt, Laufmittel 50% Methanol, 50% Wasser + 0,01% Phosphorsäure, 290 nm.



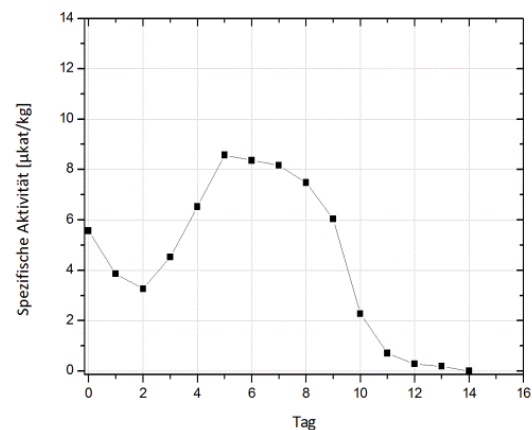
**Abbildung 57 Spezifische Aktivität der PAL im ersten Kulturverlauf in CB-M Medium.**



**Abbildung 58 Spezifische Aktivität der PAL im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.**



**Abbildung 59** Spezifische Aktivität der PAL im ersten Kulturverlauf in CB-2 Medium.



**Abbildung 60** Spezifische Aktivität der PAL im zweiten Kulturverlauf in CB-2 Medium.

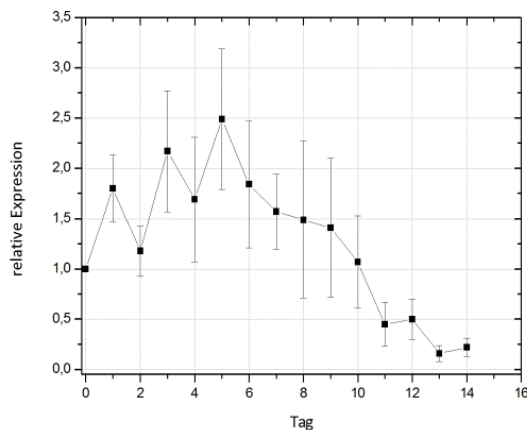
### b) Expression des PAL 2-Gens im Kulturverlauf

Für beide vermeintlichen PALs (siehe Kapitel VI.B.1.) wurde versucht, Primer für Expressionsanalysen mit qPCR zu erstellen, die spezifisch das 5'- bzw. das 3'-Ende des Gens abdecken, also die Bereiche, die mit Hilfe der Daten von Dr. Szövényi als Unterscheidungsmerkmal für zwei verschiedene Genkopien der PAL betrachtet werden. Mit Hilfe der Eurofins Internetseite war dies für die PAL 2 möglich, für PAL 1 lieferte jedoch nur die Primer3 Website Ergebnisse. Diese Primer waren allerdings von schlechter Qualität, so dass eine Aussage über die Expression von PAL nur für das PAL2 Gen gelang. Weiterhin wurden zwei Referenzgene verwendet, von denen man ausgeht, dass sie konstitutiv in Pflanzen exprimiert werden: das Gen für Actin (Act) und für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Studienlage zur Eignung dieser Gene ist widersprüchlich, jedoch ist die Tendenz dahingehend, dass GAPDH weniger stabile Expressionsmuster aufweist als Actin, aber dass diese Expressionsstabilität abhängig vom beobachteten System ist (Maroufi et al. 2010; Liu et al. 2012; Guo et al. 2014; Sinha et al. 2015). In *Anthoceros agrestis* waren die Expressionen mit Act und GAPDH als Referenzgen vergleichbar, weshalb nur die Auswertung von Actin-normierten Expressionen diskutiert wird.

Die Daten werden von der Software PikoReal™ 2.2 von ThermoScientific automatisch ausgewertet. Man erhält die „quantitation cycle“ (Cq), also die Zyklenzahl, bei der eine bestimmte Fluoreszenzschwelle des Farbstoffs SYBR Green in Interaktion mit der vervielfältigten DNA überschritten wird (Anhang Abb. 15). Dieser Wert ist idealerweise alleine abhängig von der Anzahl der cDNA Templat-Stränge und damit von der Menge an Transkripten in der RNA. Die Schmelzkurve am Ende der Messung gibt Hinweise auf die Spezifität des Produkts. Dabei sinkt die Fluoreszenz mit Zunahme der Temperatur, da der Farbstoff bei Bindung an doppelsträngige DNA eine Fluoreszenzerhöhung erfährt, durch die Temperaturzunahme jedoch die doppelsträngige DNA (dsDNA) zu einzelsträngiger DNA (ssDNA) schmilzt und der Farbstoff nicht mehr mit der DNA interagiert und weniger ausgeprägt fluoresziert. Am Schmelzpunkt liegt nur noch die Hälfte der DNA als Doppelhelix vor. Die 1. Ableitung hat hier ein Maximum, da die Steigung der Schmelzkurve bei  $T_M$  am höchsten ist (Anhang Abb. 16).

Die Kalibriergeraden der Referenzgene und der untersuchten Gene zeigen eine hohe Linearität in der Verdünnungsreihe (Anhang Abb. 17-22). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der  $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$ -Methode. Dabei wurde Actin als Referenzgen und Tag 0 als Normierung gewählt.

Die relative Expression von *PAL2* (Abb. 61) zeigte prinzipiell einen ähnlichen Verlauf wie die dazugehörigen Enzymaktivitäten im zweiten Kulturverlauf in CB-M. Abgebildet ist die Expression des Gens im Vergleich zu  $\alpha$ -Actin und auf den 0. Tag normiert. Am Anfang nahm die mRNA Menge zu, auch wenn diese Zunahme einer großen Schwankung unterlag, erreichte bei Tag 5 ihr Maximum mit der 2,5-fachen RNA Menge im Vergleich zu Tag 0 und nahm dann in Bezug auf Tag 0 drastisch ab, mit dem Minimum am 13. und 14. Tag.

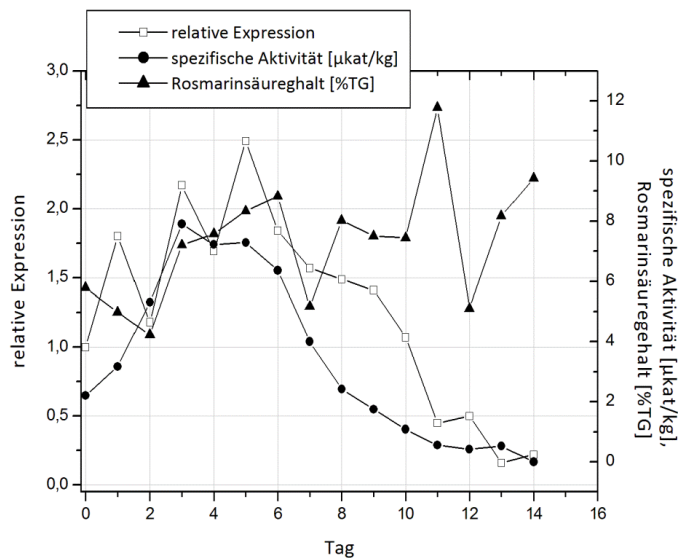


**Abbildung 61 Expression des Gens *PAL2* im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.** Normiert auf Tag 0, Referenzgen Actin, Mittelwert und Standardabweichung aus fünf Versuchen.

Was aus den Aktivitätstests und der Expressionsstudie deutlich wird, ist die Rolle der PAL im Sekundärstoffwechsel und des Sekundärstoffwechsels im Organismus. Die PAL verbindet den Primär- mit dem Sekundärstoffwechsel, indem es Phenylalanin ableitet und für andere aromatische Verbindungen bereitstellt. Im frischen Medium kann der Stoffwechsel hochgefahren werden, da genügend Nährstoffe zur Verfügung stehen. Dies drückt sich in hohen Enzym- und Expressionsaktivitäten an den Tagen 2 bis 5 aus. Eine geringe spezifische Aktivität am Ende des Kulturverlaufs lässt sich primär auf eine verringerte Expression zurückführen, einhergehend mit einer hohen Stresssituation durch das Fehlen von Nährstoffen (Zucker, Ionen), durch den hohen pH-Wert, durch hohe Zelldichten, durch lysierte Zellen und ihre eventuell toxischen Metabolite. Diese Faktoren haben letztlich einen supprimierenden Einfluss auf die Transkription und die Proteinbiosynthese des Enzyms. So könnte die Pflanze die knappen Ressourcen für Primärstoffwechselvorgänge aufwenden, die ein Überleben sicherstellen oder ein Überdauern ermöglichen. Interessant wären hierbei Messungen der Photosyntheseaktivität, der Seneszenzvorgänge oder der Mechanismen, die in der natürlichen Pflanze die Entwicklung von Sporophyten einleiten. Auch wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Elicitoren- oder UV-induzierbare Reaktivierung möglich ist, dass also ab dem 7. Tag eine Induktion versucht wird, die eine erhöhte PAL Expression und Proteinbiosynthese in der Pflanze zur Folge haben müsste. Prinzipiell decken sich die hier vorgestellten Ergebnisse mit der Kulturcharakterisierung von Corinna Weitzel von Zellsuspensionskulturen von *Melissa officinalis* über 11 Tage. Bei ihr nahm die spezifische PAL-Aktivität des Enzymrohextrakts von Tag 1 bis 5 zu, fiel dann jedoch und blieb bis zum Ende der Charakterisierung auf einem niedrigen Niveau. Dieser Verlauf wurde durch die semiquantitative PCR mit den cDNA-Proben von jedem Kulturtag bestätigt (Weitzel und Petersen 2010). Gleichzeitig beobachtete sie eine Zunahme der Rosmarinsäuremenge in %TG



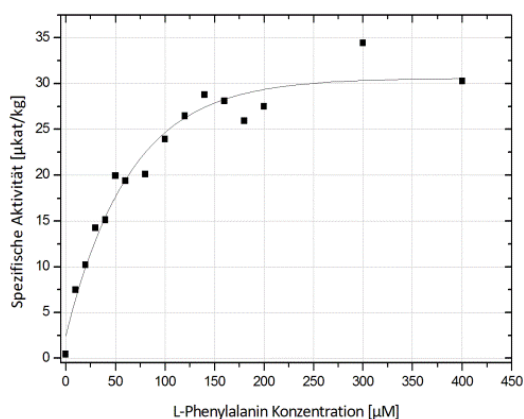
von Tag 1 bis 11 mit einer leichten Stagnation zwischen Tag 6 und 10. Sowohl bei *Anthoceros agrestis* als auch bei *Melissa officinalis* steht demnach eine Zunahme der PAL-Aktivität in Korrelation mit der Zunahme der Rosmarinsäuremenge zu Beginn des Kulturverlaufs (Abb. 62). Ähnliche Korrelationen wurden für andere rosmarinsäureproduzierende Lamiaceae oder Boraginaceae nachgewiesen, z.B. *Coleus blumei* (Razzaque und Ellis 1977) oder *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul und Ellis 1987).



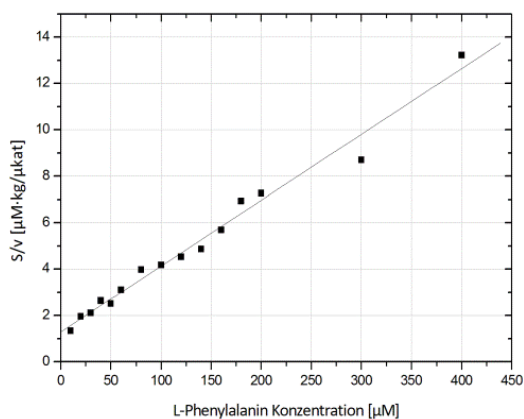
**Abbildung 62** Relative Expression und spezifische Aktivität [µkat/kg] von PAL, Rosmarinsäuregehalt [%TG] von *Anthoceros agrestis* Zellen in CB-M-Medium im Kulturverlauf.

### c) Kinetische Parameter der PAL

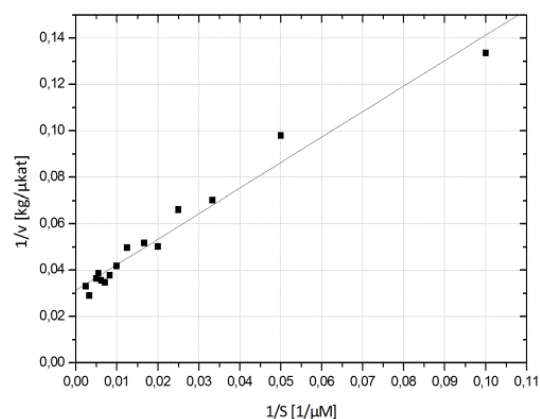
Die kinetischen Parameter der PAL wurden nur mit dem Enzymrohextrakt aus Suspensionskulturen von *Anthoceros agrestis* bestimmt, da keine Expression in *E. coli* erzielt werden konnte. Die Messungen wurden unter der Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik durchgeführt, denn obwohl PAL als Homotetramer vorliegt, wurde bisher wenn überhaupt, nur geringe negative Kooperativität beobachtet (Hyun et al. 2011). Da die Messungen mit dem Enzymrohextrakt durchgeführt wurden, handelt es sich bei den Daten um apparente  $K_M$ -Werte, da Nebenreaktionen nicht ausgeschlossen werden können. Die Aktivitätsmessungen fanden in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 400 µM Endkonzentration an L-Phenylalanin in basischem Puffer statt (Abb. 63). Die Linearisierungen nach Hanes-Woolf (Abb. 64) bzw. Lineweaver-Burk (Abb. 65) liefern für den  $K_M$ -Wert eine Größe von 45,6 bzw. 35,0 µM für L-Phenylalanin. Damit ist die PAL ein relativ spezifisches Enzym, wie es auch aus anderen Spezies beschrieben wurde. Tabelle 7 zeigt verschiedene  $K_M$ -Werte von pflanzlichen PALs mit Phenylalanin als Substrat. Es ist ersichtlich, dass die PAL aus *Anthoceros* einen eher geringen Wert aufweist. Hyun et al. weisen darauf hin, dass in der Literatur bisher Werte zwischen 11 µM und 1,7 mM beschrieben wurden (Hyun et al. 2011). Wie für viele Enzyme des Sekundärmetabolismus liegen die Werte eher im µmolaren Bereich und weisen auf eine Spezifität für das natürliche Substrat hin, wie sie auch bei anderen Enzymen beobachtet wurde (Bar-Even et al. 2011).



**Abbildung 63** Direkte kinetische Auftragung der spezifischen PAL-Aktivität gegen die Phenylalaninkonzentration.



**Abbildung 64** Hanes-Woolf-Diagramm der Werte aus Abb. 63



**Abbildung 65** Lineweaver-Burk-Diagramm der Werte aus Abb. 63

**Tabelle 7** Verschiedene  $K_M$ -Werte von pflanzlichen PALs. Re = Rohextrakt aus Zellkulturen, He = Heterolog exprimiert, HW = Linearisierung nach Hanes-Woolf, LB = Linearisierung nach Lineweaver-Burk.

Organismus	$K_M$ -Wert für Phenylalanin	Quelle
<i>Anthoceros agrestis</i> (Re)	45,3 (HW)/35,0 (LB) $\mu\text{M}$	diese Arbeit
<i>Petroselinum crispum</i> (He)	15-24,5 $\mu\text{M}$	(Appert et al. 1994)
<i>Melissa officinalis</i> (He)	47 $\mu\text{M}$	(Weitzel und Petersen 2010)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (He)	64-71 $\mu\text{M}$	(Cochrane et al. 2004)
<i>Solenostemon scutellarioides</i> ( <i>Coleus blumei</i> ) (Re)	160 $\mu\text{M}$	(Petersen et al. 1994)
<i>Helianthus annuus</i> (Re)	270 $\mu\text{M}$	(Jorrín et al. 1988)
<i>Zea mays</i> (He)	270 $\mu\text{M}$	(Rösler et al. 1997)
<i>Ocimum basilicum</i> (Re)	329 $\mu\text{M}$	(Hao et al. 1996)

## 2. Tyrosin Aminotransferase (TAT)

Die Tyrosin Aminotransferase ist zuständig für die Desaminierung von Tyrosin zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) unter gleichzeitiger Aminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat. Diese Reaktion wird auch in umgekehrter Richtung katalysiert. Damit stellt die TAT dem Stoffwechsel zum einen die proteinogenen Aminosäuren Tyrosin und Glutamat zu Verfügung, zum anderen kann die Pflanze mit pHPP über die Homogentisinsäure Tocopherole und Plastochinon herstellen. In Tieren wird pHPP über die Homogentisinsäure weiter zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut und den Stoffwechselkreisläufen zugeführt.

### a) Enzymaktivität der TAT im Kulturverlauf

Die Enzymaktivitäten der TAT sind in Zellen aus beiden Medien und in beiden Kulturverläufen sehr unterschiedlich. Es gibt nur eine Gemeinsamkeit: Ein Maximum der spezifischen Aktivität meist zwischen dem 2. und 4. Tag des Verlaufs (Abb. 66-69). Im ersten Kulturverlauf in CB-M Medium ist zu Beginn der Charakterisierung keine Aktivität nachweisbar, sie nimmt zum dritten Tag (Maximum, 37  $\mu\text{kat/kg}$ ) zu und fällt dann (mit dem „Ausrutscher“ an Tag 6) bis zum 10. Tag ab, steigt danach wieder bis zum Ende des Verlaufs. Anders verhält es sich im zweiten Kulturverlauf in CB-M. Hier fängt die Charakterisierung mit einer Grundaktivität von 15  $\mu\text{kat/kg}$  bei Tag 0 an, erreicht an Tag 3 wieder das Maximum mit 43  $\mu\text{kat/kg}$  und fällt dann auf nicht nachweisbare Aktivität am Ende des Verlaufs ab, wobei zwischen Tag 7 und 13 ein relativ konstantes Niveau gehalten wurde, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass der finale Abfall der Restaktivität dergestalt reproduzierbar ist. Im CB-2 Medium fangen beide Charakterisierungen mit einer hohen spezifische Aktivität an, im ersten Verlauf erreicht diese einen Wert von knapp 75  $\mu\text{kat/kg}$ , im zweiten Verlauf liegt er bei 7  $\mu\text{kat/kg}$ . Nach einem Abfall am zweiten Tag steigt die Aktivität bei beiden wieder und erreicht den Höhepunkt am 4. Tag mit etwa 80  $\mu\text{kat/kg}$  im ersten und 12  $\mu\text{kat/kg}$  im zweiten Verlauf. Die Aktivität fällt dann bei beiden wieder, erreicht zwischen den Tage 10-12 das Minimum und steigt zum Schluss wieder ein wenig.

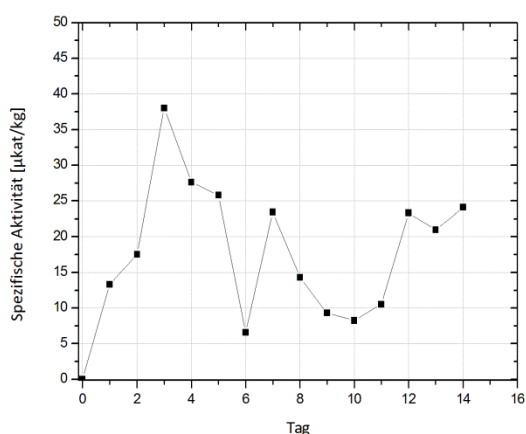


Abbildung 66 Spezifische Aktivität der TAT im ersten Kulturverlauf in CB-M Medium.

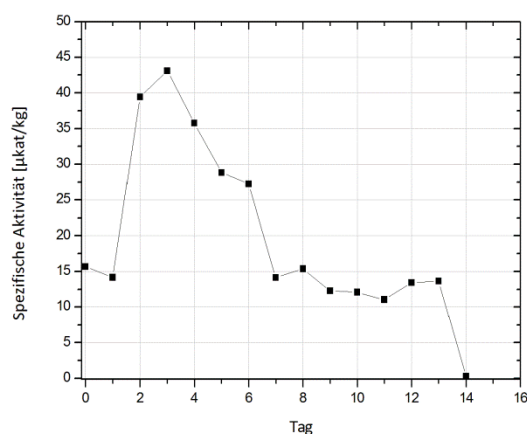
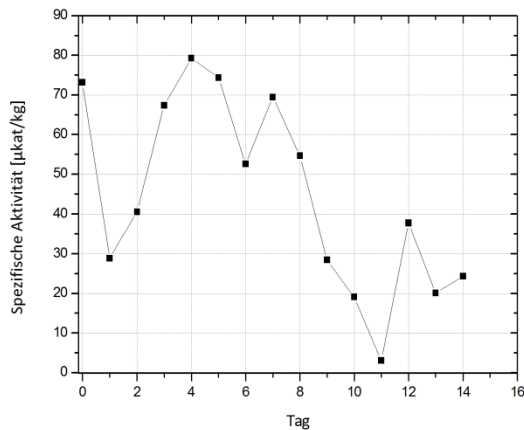
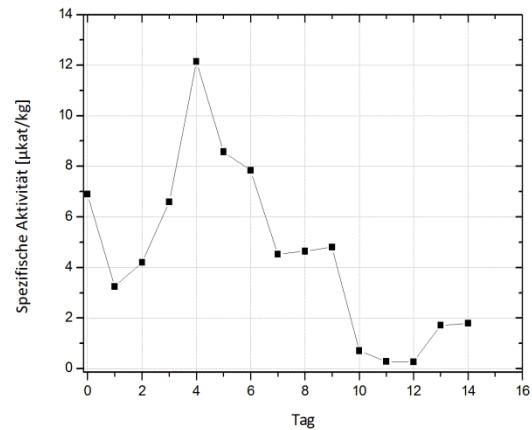


Abbildung 67 Spezifische Aktivität der TAT im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.

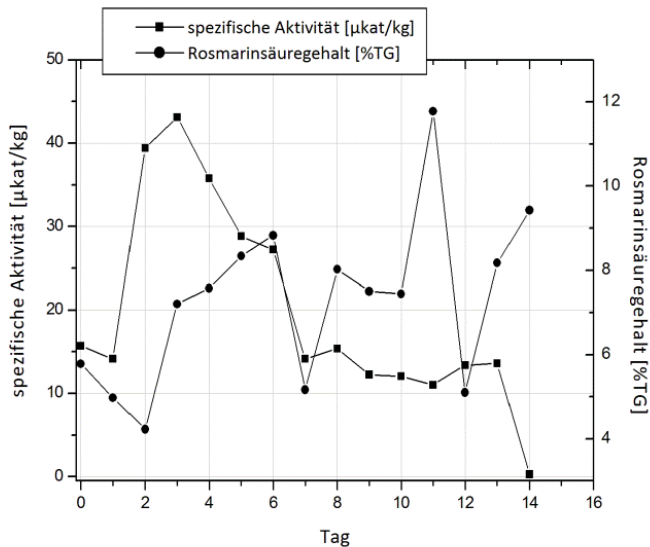


**Abbildung 68** Spezifische Aktivität der TAT im ersten Kulturverlauf in CB-2 Medium.



**Abbildung 69** Spezifische Aktivität der TAT im zweiten Kulturverlauf in CB-2 Medium.

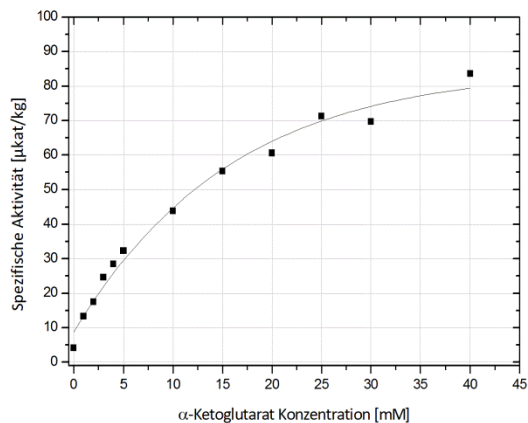
Prinzipiell lassen sich aus diesen Daten die gleichen Schlussfolgerungen ziehen wie sie bei der PAL besprochen wurden (Kapitel VI.C.1.): Die starke initiale Enzymaktivität zwischen dem 2. und 5. Tag deutet eine prinzipiell hohe Stoffwechselaktivität durch einen Nährstoffüberfluss im neuen Medium hin, gefolgt von einem Abfall der Aktivität, der jedoch nicht so stark ausfiel wie bei der PAL, und damit der Tatsache Rechnung trägt, dass die TAT kein reines Sekundärmetabolismusenzym darstellt, sondern für wichtige Metabolite, die sich aus der Homogentisinsäure ableiten und damit für die Photosynthese notwendig sind, gebraucht wird. Corinna Weitzel untersuchte in ihrer Dissertation die spezifische TAT-Aktivität von *Melissa officinalis* Zellen in CB-2 Medium und beobachtete eine Zunahme der TAT-Aktivität von Tag zwei bis vier. Am vierten Tag wurde das Maximum erreicht (32,6 µkat/kg), anschließend nahm die spezifische Aktivität bis zum Ende des Kulturverlaufs ab (Weitzel 2009). Eine Abhängigkeit der Rosmarinsäuremenge von der TAT-Aktivität in *Anschusa officinalis* Zellkulturen stellten De-Eknamkul und Ellis 1987 her (De-Eknamkul und Ellis 1987). Eine so konsistente Korrelation wie in ihrer Arbeit konnte hier nicht beobachtet werden (Abb. 70). Dies kann an der eben erwähnten Funktion der TAT für viele andere Stoffwechselwege liegen. Dass mehrere Isoformen der TAT in *Anthoceros agrestis* vorliegen, ist möglich, jedoch wurde in den Sequenzdaten von Dr. Szövényi nur eine putative TAT-Sequenz aufgelistet.



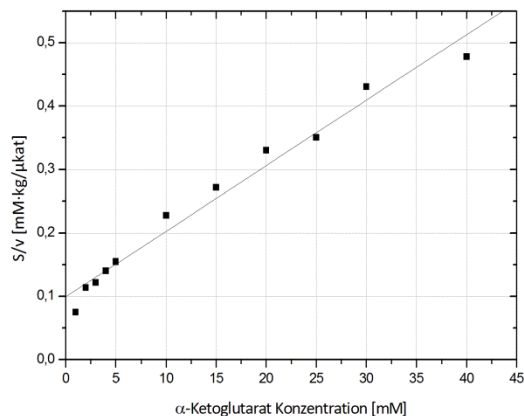
**Abbildung 70** Spezifische Aktivität [μkat/kg] von TAT, Rosmarinsäuregehalt [%TG] von *Anthoceros agrestis* Zellen in CB-M-Medium im Kulturverlauf.

### b) Kinetische Parameter der TAT

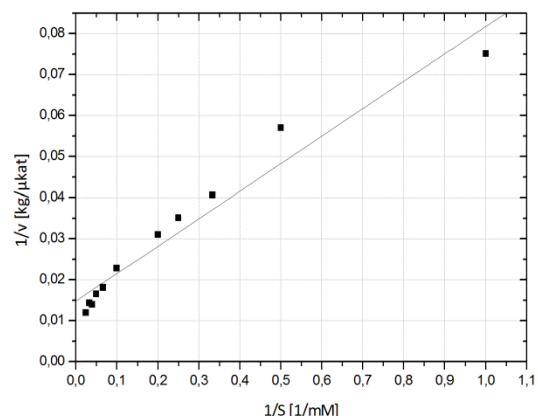
Die kinetischen Parameter der TAT wurden ebenfalls mit Hilfe des Enzymrohextrakts bestimmt. Dabei wurde für L-Tyrosin ein Konzentrationsbereich von 1 bis 6 mM und für α-Ketoglutarat ein Bereich von 1 bis 40 mM verwendet, während das jeweils zweite Substrat in Sättigung bzw. maximaler Löslichkeit vorlag. Die geringe Löslichkeit des Tyrosins bewirkt in diesem Zusammenhang, dass nie die Sättigung erreicht werden kann. Dadurch sind diese apparenten  $K_M$ -Werte nur eine Näherung.



**Abbildung 71** Direkte kinetische Auftragung der spezifischen TAT-Aktivität gegen die α-Ketoglutaratkonzentration.

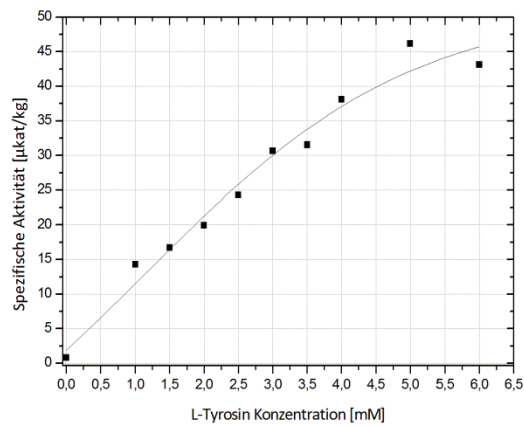


**Abbildung 72 Hanes-Woolf-Diagramm der Werte aus Abb. 71 (Substrat  $\alpha$ -Ketoglutarat).**

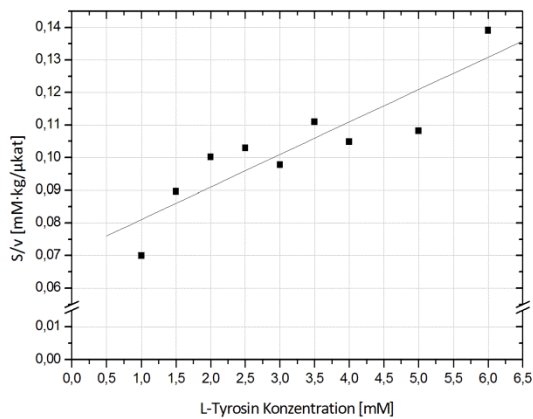


**Abbildung 73 Lineweaver-Burk-Diagramm der Werte aus Abb. 71 (Substrat  $\alpha$ -Ketoglutarat).**

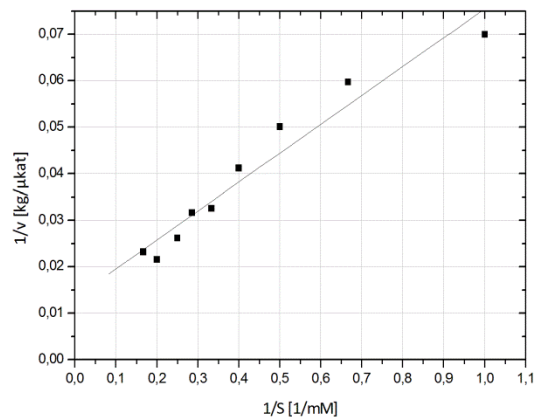
Für  $\alpha$ -Ketoglutarat (Abb. 71-73) ergibt sich ein apparenter  $K_M$ -Wert von 9,61 mM (Hanes-Wolf) bzw. 4,53 mM (Lineweaver-Burk). Für L-Tyrosin (Abb. 74-76) liegen die Werte bei 7,14 mM (Hanes-Wolf) bzw. 4,65 mM (Lineweaver-Burk). Die Werte sind deutlich höher als für die TAT At5g36160 aus *Arabidopsis thaliana* (Tyr:  $0,19 \pm 0,16$  mM,  $\alpha$ KG:  $1,2 \pm 0,27$  mM) (Prabhu und Hudson 2010) oder aus Schlafmohn (TyrAT aus *Papaver somniferum*, Tyr:  $1,92 \pm 0,09$  mM,  $\alpha$ KG:  $0,35 \pm 0,09$  mM) (Lee und Facchini 2011). Diese TATs wurden heterolog exprimiert und liegen als gereinigte Enzyme vor. Da die Aminotransferasen nicht spezifisch nur eine Aminosäure als Substrat verwenden, können Tyrosin und  $\alpha$ -Ketoglutarat auch von anderen Aminotransferasen verwendet werden, etwa von der Aspartat Aminotransferase, die mit der TAT verwandt ist (Mehta et al. 1993). Beide Substrate sind auch sonst in vielen Stoffwechselprozessen involviert, etwa das  $\alpha$ -Ketoglutarat im Citratzyklus. Somit ist der oben erwähnte apparente Charakter der  $K_M$ -Werte zu erklären, der bei aufgereinigten Enzymen nicht zum Tragen kommt. Corinna Weitzel hat in ihrer Doktorarbeit über die Rosmarinsäurebiosynthese in Zitronenmelisse ebenfalls die Kinetik der TAT aus Enzymrohextrakten einer Zellkultur gemessen (Weitzel 2009). Sie erhielt einen  $K_M$ -Wert von 7,2 mM für Tyrosin und 28  $\mu$ M für  $\alpha$ -Ketoglutarat nach Lineweaver-Burk und 40  $\mu$ M nach Hanes-Wolf. Hier ist der Wert für Tyrosin vergleichbar hoch, während  $\alpha$ -Ketoglutarat einen deutlich geringeren Wert aufweist als zum Beispiel auch Schlafmohn oder Ackerschmalwand. Auch hier war eine Sättigung des Tyrosins nicht möglich gewesen, so dass es sich bei ihren Werten ebenfalls um Näherungen handelt.



**Abbildung 74** Direkte kinetische Auftragung der spezifischen TAT-Aktivität gegen die Tyrosinkonzentration



**Abbildung 75** Hanes-Woolf-Diagramm der Werte aus Abb. 74 (Substrat Tyrosin)

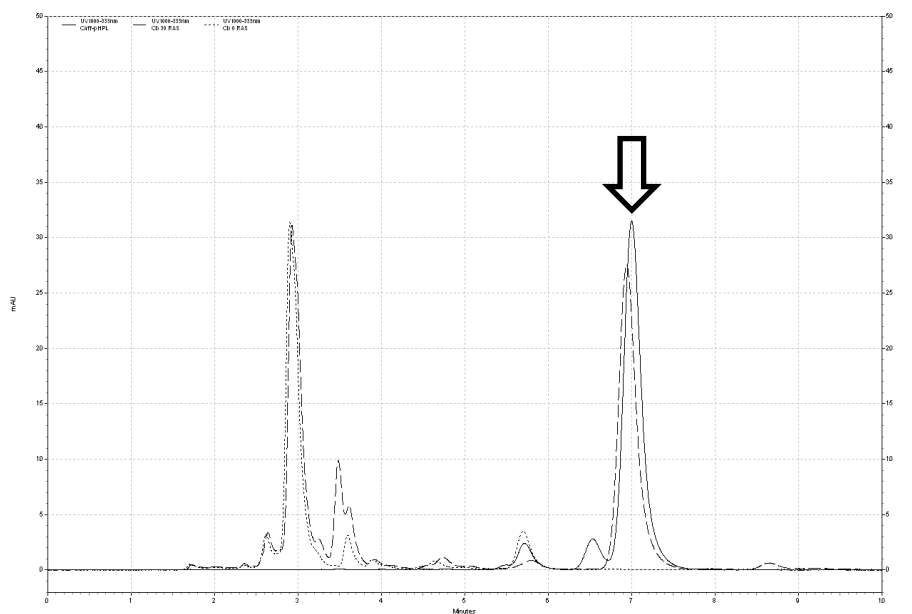


**Abbildung 76** Lineweaver-Burk-Diagramm der Werte aus Abb. 74 (Substrat Tyrosin)

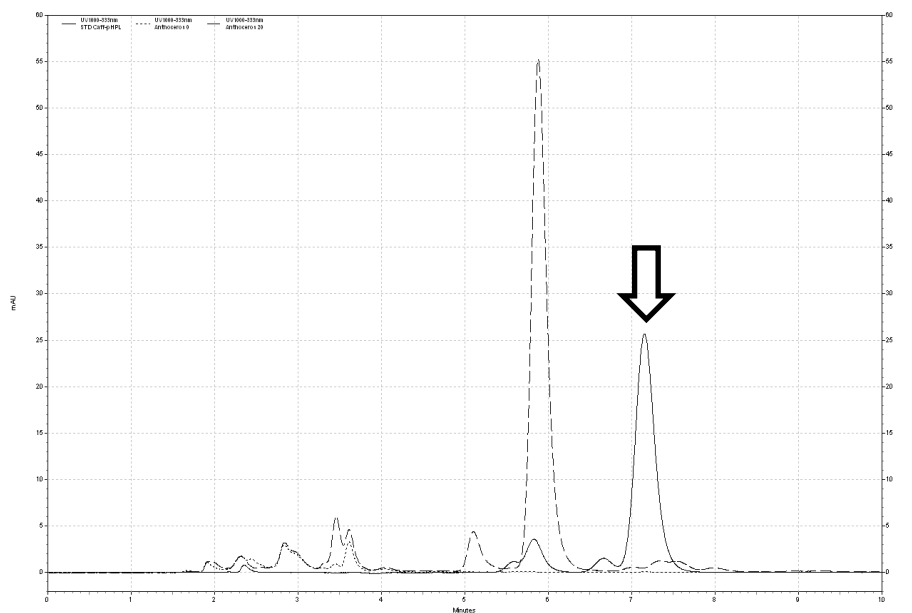
### 3. Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs)

#### a) Aktivitätstest der HCTs

Die Charakterisierung der HCTs aus *Anthoceros agrestis* war neben der Identifizierung der dazugehörigen Gene ein wichtiger Teil dieser Arbeit, die das Ziel hatte, zu untersuchen, ob die Rosmarinsäurebiosynthese nach dem gleichen Stoffwechselweg verläuft, wie er in Lamiaceae nachgewiesen wurde (Abb. 77), dar. Dazu wurden RAS-Aktivitätstests in verschiedensten Variationen mit dem Enzymrohextrakt aus *Anthoceros agrestis* durchgeführt (Abb. 78 und Tabelle 8) und jede Variation mehrmals wiederholt.



**Abbildung 77 HPLC-Chromatogramm eines RAS-Tests mit *Coleus blumei*-Rohextrakt.** Durchgehende Linie = Caffeoylphosphatidylethanolamine-Standard, gestrichelte Linie = 30 Minuten Inkubation, gepunktete Linie = Kontrolle (0 Minuten Inkubation). Der gestrichelte Peak unterhalb des Standardpeaks (Pfeil) ist das RAS-Produkt, Laufmittel 50% Methanol/50% Wasser + 0,01% Phosphorsäure, 333 nm.



**Abbildung 78 HPLC-Chromatogramm eines RAS-Tests mit *Anthoceros agrestis*-Rohextrakt.** durchgehende Linie = Caffeoylphosphatidylethanolamine-Standard, gestrichelte Linie = 20 Minuten Inkubation, gepunktete Linie = Kontrolle (0 Minuten Inkubation). Der gestrichelte Peak unterhalb des Standardpeaks (Pfeil) ist kein RAS-Produkt, Laufmittel 50% Methanol/50% Wasser + 0,01% Phosphorsäure, 333 nm.

Interessant war in diesem Zusammenhang ein Test, bei dem das Enzymrohextrakt aus *Melissa officinalis* mit der gleichen Menge an *Anthoceros agrestis* Enzymextrakt inkubiert wurde. Als Kontrolle diente eine Verdünnung des Melissenenzym mit Puffer gleichen Volumens. Erwartet wurde eine Abnahme der Aktivität der Mo RAS um die gleiche Menge, tatsächlich war die Abnahme



der Aktivität im Co-Inkubat mit dem Hornmoosextrakt um 1/3 höher. Die Vermutung liegt nahe, dass das Enzymrohextrakt des Hornmooses inhibierende Substanzen enthält, die zu den negativen Ergebnissen in den Enzymtests führen könnten. Deshalb wurde eine andere Enzympräparation verwendet: Mit der Acetonpulver-Methode wurde versucht, solche inhibierenden Substanzen zu entfernen. Dies wird bei dieser Methode nur gelingen, wenn es sich dabei um hydrophobe Stoffe handelt, die in den organischen Lösungsmitteln löslich sind. Auch diese Methode blieb jedoch letztlich erfolglos, so dass die funktionelle Proteinanalyse der heterolog exprimierten HCTs als aussichtsreichste Möglichkeit übrig blieb, die RAS-Aktivität von HCTs aus *Anthoceros* nachzuweisen.

#### Standardtest auf HCT-Aktivität

Gesamtvolumen 125 µl

67,5 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0

12,5 µl 0,1 M DTT

10 µl 12,5 mM Ascorbinsäure

5 µl 20 mM Akzeptor (in 20% Ethanol)

10 µl 2,5 mM Donor

20 µl Enzym (Start)

Δt (Inkubationszeit 5 Min-24 h, i.d.R. 15-30 Minuten, 30 °C) + 0 Min (Kontrolle/Eis)

Stopp mit 20 µl 6 M HCl, 2x 500 µl Ethylacetat

**Tabelle 8 Wichtigste Variationen des HCT-Tests, die im Verlauf der Arbeit untersucht wurden. Jede der genannten Variationen wurde mehrmals wiederholt.**

Enzym	Acyl-Donor	Acyl-Akzeptor	Puffer/ pH	Tempera- tur [°C]	Zusätze	Messung
Standard (20 µl)	Caffeoyl-CoA (200 µM)	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Änderung des Enzym- volumens (10-50 µl)	Caffeoyl-CoA	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Standard	4-Cumaroyl- CoA	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Standard	Caffeoyl-CoA	DHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Standard	Caffeoyl-CoA	pHPL	Tris-HCl, Borsäure- Borax-Puffer, Acetatpuffer 6,0-8,0	30	-	HPLC
Standard	Caffeoyl-CoA	pHPL	KPi, 7,0	25-42	-	HPLC
Standard	Caffeoyl-CoA	pHPL	KPi, 7,0	30	Metallionen, Cofaktoren	HPLC
Standard	Caffeoyl-CoA	pHPL	KPi, 7,0	30	-	photometrisch (Ellmans Reagenz)
Standard	Caffeoyl- Glucose	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Standard	Caffeoyl-CoA (Änderung	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC

	der Donor- menge)					
Co-Inkubat mit <i>Melissa officinalis</i> Enzym	Caffeoyl-CoA	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Standard	Caffeoyl-CoA	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC, Laufmittel- zusammen- setzung
Kombination mit 4CL-Test	4- Cumarsäure + Coenzym A	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Kombination mit HPPR-Test	Caffeoyl-CoA	pHPP	KPi, 7,0	30	-	HPLC
Acetonpulver- Extrakt	Caffeoyl-CoA	pHPL	KPi, 7,0	30	-	HPLC

### **b) Heterologe Expression von HCTs in *E. coli***

Insgesamt lagen drei Expressionskonstrukte für HCTs aus *Anthoceros* sowie vier Konstrukte der HCTs aus *Physcomitrella* zur Verfügung. AaHCT1 konnte in schwachen Mengen exprimiert werden, lag jedoch ausschließlich als Einschlusskörperchen vor, AaHCT2 konnte in hoher Ausbeute löslich in *E. coli* exprimiert werden (min. 3,1 mg/100 ml LB), AaHCT5 konnte nicht exprimiert werden (Abb. 79-81). Da das Vorhandensein von Einschlusskörperchen häufig mit dem Vorhandensein von geringen Mengen des korrekt gefalteten Enzyms einhergeht, die gelelektrophoretisch nicht nachweisbar sind, wurden HCT-Tests mit den Rohextrakten und dem Protein nach der Affinitätschromatographie über Ni-NTA durchgeführt. In allen Fällen wurde mit den untersuchten Kombinationen an Donor (meist Caffeoyl-CoA, alternativ 4-Cumaroyl-CoA) und Akzeptor (siehe unten) sowie in den verschiedenen Laufmittelsystemen (30-50% Methanol/70-50% Wasser + 0,01% Phosphorsäure oder 0,25% Essigsäure, Messung bei 333 bzw. 280 nm) keine Bildung eines spezifischen Produkts nachgewiesen werden (Abb. 82). Die Bildung des Produkts wurde über eine spezifische Änderung des Chromatogramms nach der Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Inkubation definiert, da vielfach keine Standardproben vorlagen. Das Fehlen dieser spezifischen Peaks weist auf das Fehlen der Enzymaktivität im Test hin.

#### **Standardtest auf HCT-Aktivität mit heterolog exprimiertem Enzym**

Gesamtvolumen 125 µl

67,5 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0

12,5 µl 0,1 M DTT

10 µl 12,5 mM Ascorbinsäure

5 µl 20 mM Akzeptor (siehe unten, in 20% Ethanol)

2 µl 2,5 mM Caffeoyl- oder 4-Cumaroyl-CoA

20 µl heterologes Enzym (Start)

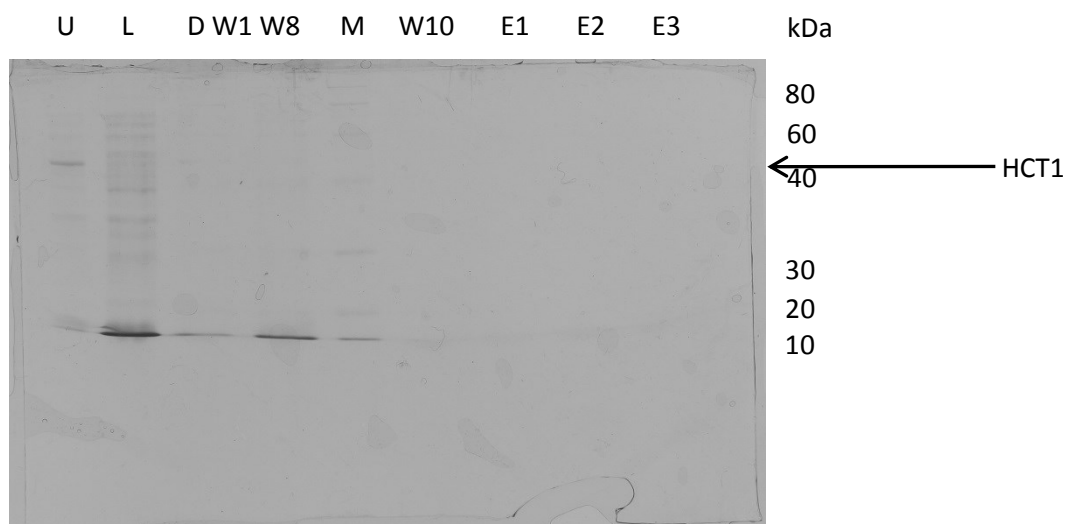
30 Min (Inkubation, 30 °C) + 0 Min (Kontrolle/Eis)

Bei den verwendeten Akzeptoren handelt es sich um:

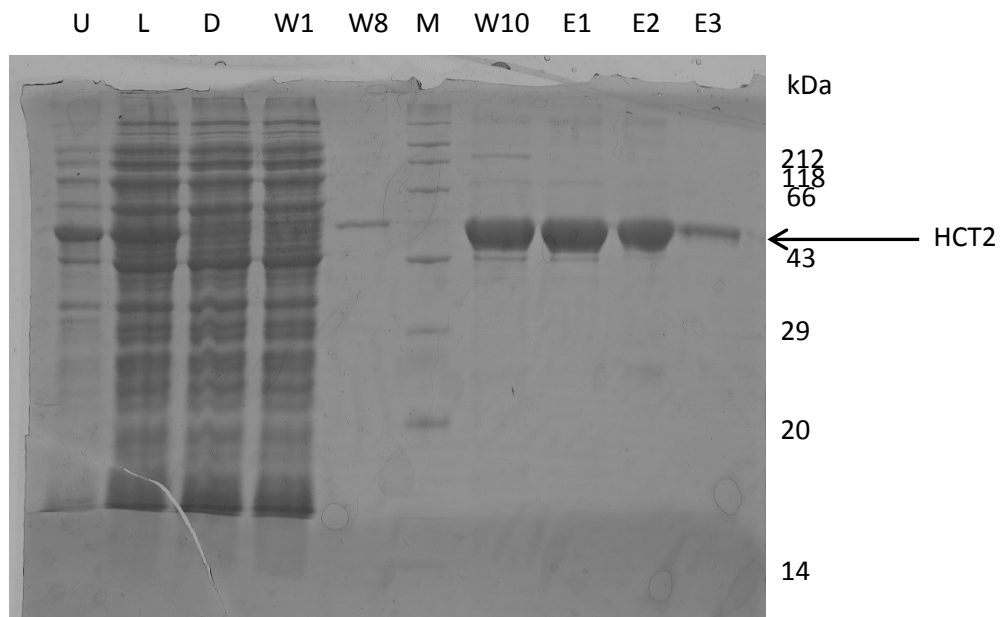
DL-4-Hydroxyphenylmilchsäure (pHPL)	Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure)
DL-3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure (DHPL)	3-Hydroxybenzoesäure
D-Phenylalanin	4-Hydroxybenzoesäure
L-Phenylalanin	2,3-Dihydroxybenzoesäure
Shikimisäure	2,4-Dihydroxybenzoesäure
Chinasäure	DL-Äpfelsäure
4-Hydroxybenzylalkohol	D-Weinsäure
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	L-Weinsäure
3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol	DL- und meso-Weinsäure
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-propanol	D-Milchsäure
<i>t</i> -Zimtalkohol	L-Milchsäure
Coniferylalkohol	DL-Milchsäure
3,4-Dimethoxy-Zimtalkohol	L-Glutaminsäure
Anthranilsäure (2-Aminobenzoesäure)	

Damit bleiben die Aktivität und die Substrate der gefundenen Enzyme unbekannt und bedürfen intensiverer Erforschung.

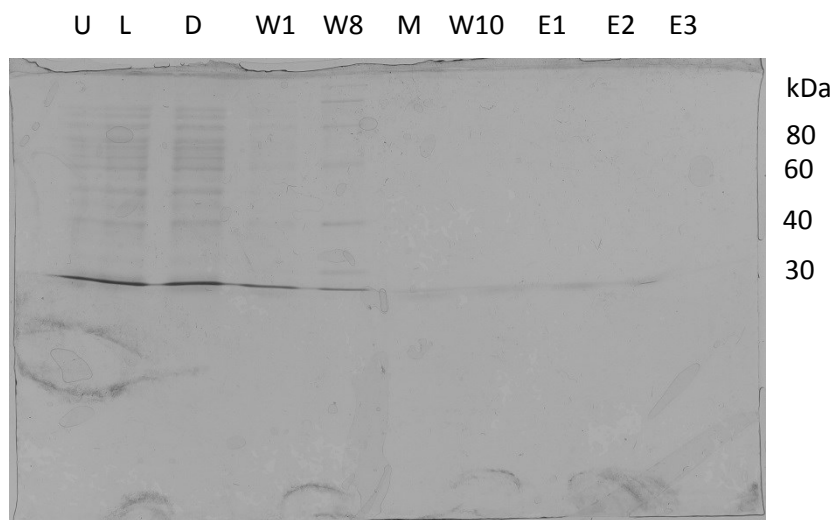
Das Problem der Einschlusskörperchen ist sehr häufig bei HCTs zu finden. Vielfach wird versucht, mit verminderter IPTG-Konzentration oder kühleren Expressionstemperaturen eine korrekte Faltung zu erreichen, was hier jedoch nicht erfolgreich war. Alternativ wären die Verwendung von anderen Vektoren und *E. coli* Stämmen oder Hefen. Schließlich bleibt die Aufreinigung der Einschlusskörperchen und die Umfaltung in die native Form *in vitro* auszuprobieren, was jedoch hier aufgrund von Zeitmangel nicht mehr durchgeführt werden konnte. Marion Sander und Anne Döring konnten in ihren Dissertationen diese Methode erfolgreich anwenden (Sander 2010; Döring 2013).



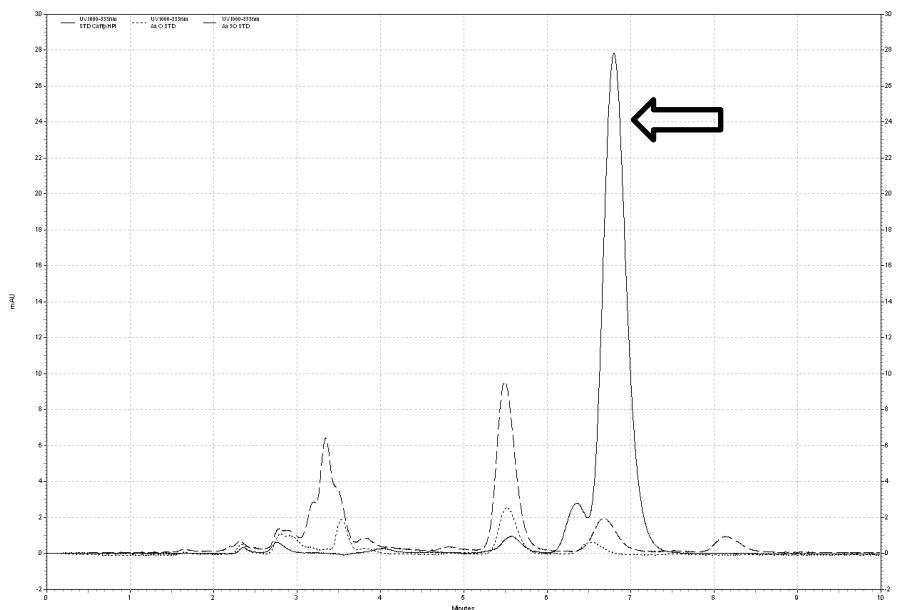
**Abbildung 79** Heterolog exprimierte AaHCT1. Erwartet 49 kDa, LB-Medium, 1 mM IPTG, 25 °C, 16 h, U = unlösliche Fraktion, L = lösliche Fraktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktionen, M = Größenmarker, E = Elutionsfraktionen.



**Abbildung 80** Heterolog exprimierte AaHCT2. Erwartet 47 kDa, LB-Medium, 1 mM IPTG, 25 °C, 16 h, Enzymausbeute 3,1 mg/100 ml LB, U = unlösliche Fraktion, L = lösliche Fraktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktionen, M = Größenmarker, E = Elutionsfraktionen. Mit den Waschfraktionen 9 und 10 (höhere Imidazolkonzentration) ist ein Teil von AaHCT2 verloren gegangen



**Abbildung 81** Heterolog exprimierte AaHCT5. Erwartet 54 kDa, LB-Medium, 1 mM IPTG, 25 °C, 16 h, U = unlösliche Fraktion, L = lösliche Fraktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktionen, M = Größenmarker, E = Elutionsfraktionen.



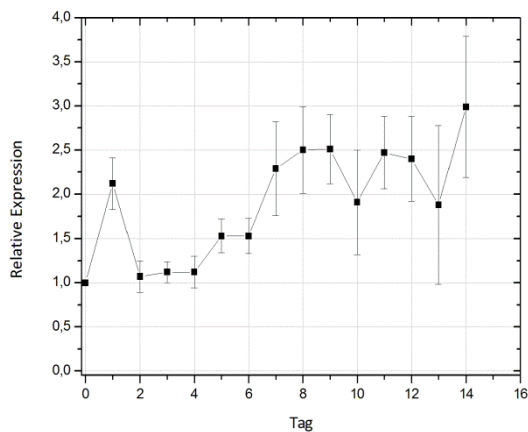
**Abbildung 82 HPLC-Chromatogramm eines RAS-Tests mit heterolog exprimierte AaHCT2.** Durchgehende Linie = CaffeoylPPL-Standard, gestrichelte Linie = 30 Minuten Inkubation, gepunktete Linie = Kontrolle (0 Minuten Inkubation). Der gestrichelte Peak unterhalb des Standardpeaks (Pfeil) ist kein RAS-Produkt, Laufmittel 50% Methanol/50% Wasser + 0,01% Phosphorsäure, 333 nm.

### c) Expression der HCTs im Kulturverlauf

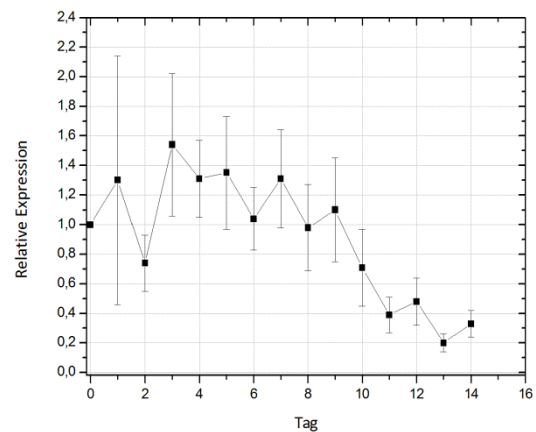
Die Expressionsstudien wurden mit der cDNA durchgeführt, die aus Zellen des zweiten Kulturverlaufs in CB-M Medium hergestellt wurde. Untersucht wurden die HCTs 1, 2 und 5 aus *Anthoceros agrestis*. Dabei sind drei prinzipielle Verläufe sichtbar (unter Nichtbeachtung des Wertes für Tag 1 (siehe Kapitel VI.A.) und der einzelnen Ausreißer): HCT 1 (Abb. 83) zeigt eine stetige Zunahme der relativen Expression, erreicht am Ende das Dreifache der ursprünglichen Expressionsrate. HCT 2 (Abb. 84) hingegen zeigt eine Abnahme, angefangen vom 3. Tag (1,5-fache der ursprünglichen Expression) bis zum 13. Tag (1/5 des Ausgangswerts). HCT 5 (Abb. 85) schließlich ist ein Sonderfall. Hier zeigt sich eine prinzipielle Zunahme der Expression, aber diese tritt in den Hintergrund durch die massive Zunahme der Expression an Tag 7, die das Achtfache vom normierten Wert an Tag 0 erreicht. Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass die Werte den Durchschnitt und die Standardabweichung von fünf Messungen darstellen. Zwischen der dritten und der vierten Messreihe wurde die cDNA neu synthetisiert. Dabei ergibt sich bei der HCT 5 wieder ein ganz anderes Bild, wenn man die einzelnen cDNA-Chargen vergleicht (Abb. 86). Hier sieht man, dass die drei ersten Messungen für diese starke Zunahme an Tag 7 und 8 verantwortlich sind (cDNA 1), während die 4. und 5. Messungen (cDNA 2) einen gleichmäßigen Anstieg der relativen Expression mit einem Maximum an Tag 13 mit der dreifachen Überexpression der RNA aufweisen. Eine dritte cDNA Charge wurde speziell für die HCT 5 erzeugt und bestätigte das Ergebnis der zweiten Charge der cDNA, während eine vierte Wiederholung der qPCR mit der ersten cDNA in Übereinstimmung mit den Messungen 1-3 ist. Da diese scheinbaren Unterschiede in der Expressionsrate bei den anderen untersuchten Genen nicht beobachtet wurden, bleibt die Ursache dafür ungeklärt und liegt wahrscheinlich in experimentellen Problemen. Ausgehend von der Tatsache, dass der Rosmarinsäuregehalt in Zellen aus CB-M Medium kontinuierlich bis zum Ende des Kulturverlaufs zunimmt, könnte man, bei Annahme eines direkten Zusammenhangs zwischen Produkt-, Enzym- und Transkriptmenge, davon ausgehen, dass die Expression im Verlauf der zwei Wochen auch zunimmt. Damit würden, von den hier dargestellten Genen, HCT 1 und 5 als RAS Kandidaten in Frage kommen.

Allerdings liegt diesem einfachen Modell nicht der Gedanke zu Grunde, dass die Rosmarinsäuremenge im Kulturverlauf akkumuliert wird, so dass nicht zwangsweise mehr neues Enzym nötig ist, sondern mit weniger Enzym die Menge an Rosmarinsäure, die später synthetisiert wird, zu dem bereits vorhandenen Pool hinzugefügt wird und somit der Gehalt steigt. In dem Fall bleibt auch HCT 2 als interessanter Kandidat erhalten.

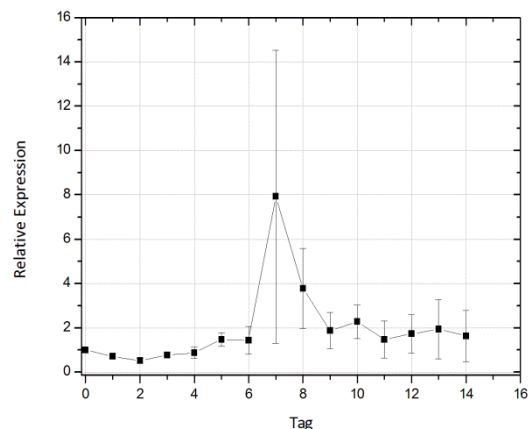
Weitzel und Petersen untersuchten die Aktivität der RAS und ihre semiquantitative Expression aus *Melissa officinalis*-Zellen in einem Kulturverlauf (Weitzel und Petersen 2011). Sie kamen zu dem Ergebnis, die die RAS eine starke Aktivität und Expression zwischen den Tagen 1 und 5 aufwies, danach ließen beide Parameter nach und waren gegen Ende der Kulturverlaufs nicht mehr nachweisbar. Eine Korrelation der spezifischen Enzymaktivität und der Akkumulation verschiedener Kaffeesäureester wurde auch in Sporophyten des Ackerschachtelhalms *Equisetum arvense* über eine Vegetationsperiode untersucht und nachgewiesen (Hohlfeld et al. 1996). Auch in Anbetracht dieser Beobachtung ist die HCT 2 ein interessanter Kandidat für eine mögliche RAS-Aktivität.



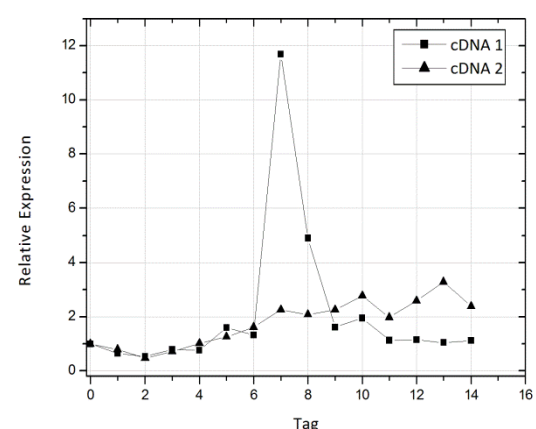
**Abbildung 83 Expression des Gens *HCT1* im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.** Normiert auf Tag 0, Referenzgen Actin, Mittelwert und Standardabweichung aus fünf Versuchen.



**Abbildung 84 Expression des Gens *HCT2* im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.** Normiert auf Tag 0, Referenzgen Actin, Mittelwert und Standardabweichung aus fünf Versuchen.



**Abbildung 85 Expression des Gens *HCT5* im zweiten Kulturverlauf in CB-M Medium.** Normiert auf Tag 0, Referenzgen Actin, Mittelwert und Standardabweichung aus fünf Versuchen.



**Abbildung 86 Expression von *HCT5* in Abhängigkeit der verwendeten cDNA.**

#### 4. Andere Enzyme

Für die anderen löslichen Enzyme der Rosmarinsäurebiosynthese (4CL und HPPR) wurden Aktivitätstest mit Enzymrohextrakten durchgeführt. Diese ließen sich jedoch nicht reproduzieren oder qualitativ auswerten. Dies zeigte sich etwa beim HPPR-Test durch eine mangelnde Peaktrennung in der HPLC trotz Verwendung verschiedener Säulen und Laufmittelzusammensetzungen. Beim 4CL-Test konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Enzymmenge, Substrat und Produkt gezeigt werden, so dass beide Tests nicht ohne weitere vorherige intensive Optimierung angewandt werden konnten. Alternativ dazu muss erwogen werden, die Arbeiten auf heterolog exprimiertes Enzym zu beschränken, da so störende HPLC-Banden oder UV/VIS-Absorptionen verringert werden können.

### D. Charakterisierung von Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Physcomitrella patens*

#### 1. Auswahl und Amplifizierung von Hydroxycinnamoyltransferasen

Die Gensequenz des Modellorganismus *Physcomitrella patens* ist bereits aufgeklärt (Rensing et al. 2008), aber viele Enzymaktivitäten sind noch unerforscht, ebenso die in diesem Laubmoos akkumulierten Sekundärmetabolite. Ziel dieses Teilprojekts war es, bezüglich der Kaffeesäurederivate Kandidatengene für Ester- bzw. Amidbildungsreaktionen durch Hydroxycinnamoyltransferasen zu finden. Dazu wurden die zwölf bekannten HCTs des *Physcomitrella* Genoms in der cosmass.org Datenbank abgerufen und die codierenden Sequenzen über die Funktion Blast der NCBI-Datenbank mit anderen bekannten HCTs verglichen. Von den zwölf Proteinen hatten fünf eine hohe Sequenzähnlichkeit mit HSTs, HQTs oder HCS/QTs (Tabelle 9, fett unterlegte Proteine wurden für die Charakterisierung ausgewählt).

**Tabelle 9** Proteinalignment der zwölf *Physcomitrella patens* HCTs der cosmass Datenbank über BLASTp. Aufgeführt sind jeweils die drei ersten Sequenzen, die nicht aus *Physcomitrella* stammen, sortiert nach dem E-Wert.

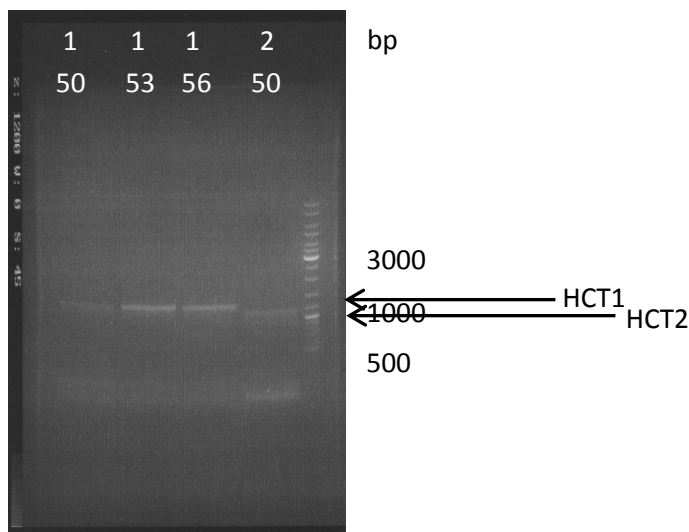
Pp HCT	Beste Treffer des Alignments	Accession number	% Identität	E-Wert
Pp1s150_128V6.1	PREDICTED: omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase-like [ <i>Nicotiana tomentosiformis</i> ]	XP_009600109.1	57	$2 \cdot 10^{-169}$
	PREDICTED: omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase-like [ <i>Nicotiana sylvestris</i> ]	XP_009770247.1	57	$2 \cdot 10^{-168}$
	PREDICTED: omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase-like [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]	XP_010249109.1	55	$1 \cdot 10^{-167}$
Pp1s15_356V6.1	shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase [ <i>Cucumis sativus</i> ]	NP_001295843.1	34	$3 \cdot 10^{-73}$
	hypothetical protein Csa_7G431440 [ <i>Cucumis sativus</i> ]	KG45212.1	34	$3 \cdot 10^{-73}$
	hydroxycinnamoyl transferase [ <i>Solenostemon scutellarioides</i> ]	CBI83579.1	33	$5 \cdot 10^{-73}$
Pp1s15_356V6.2	hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase [ <i>Pinus pinaster</i> ]	CCC55431.1	35	$5 \cdot 10^{-71}$
	unknown [ <i>Picea sitchensis</i> ]	ABR17170.1	34	$7 \cdot 10^{-71}$
	hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase [ <i>Pinus massoniana</i> ]	AKJ87097.1	35	$1 \cdot 10^{-70}$

Pp1s164_113V6.1	hypothetical protein BOTBODRAFT_34444 [ <i>Botryobasidium botryosum</i> FD-172 SS1]	KDQ12476.1	74	0,0
	hypothetical protein SCHPADRAFT_928093 [ <i>Schizopora paradoxa</i> ]	KLO14152.1	55	0,0
	hypothetical protein CYLTODRAFT_372540 [ <i>Cylindrobasidium torrendii</i> FP15055 ss-10]	KIY69553.1	53	$2 \cdot 10^{-179}$
Pp1s16_277V6.1	BAHD family acyltransferase, clade V [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002992378.1	37	$1 \cdot 10^{-101}$
	BAHD family acyltransferase, clade V [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002967754.1	37	$9 \cdot 10^{-101}$
	PREDICTED: omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase-like [ <i>Elaeis guineensis</i> ]	XP_010930413.1	38	$2 \cdot 10^{-93}$
Pp1s22_138V6.1	probable hydroxycinnamoyltransferase [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002979061.1	53	$4 \cdot 10^{-159}$
	probable hydroxycinnamoyltransferase [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002991534.1	54	$1 \cdot 10^{-158}$
	hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase [ <i>Pinus radiata</i> ]	ABO52899.1	53	$4 \cdot 10^{-156}$
Pp1s266_39V6.3	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002991344.1	51	$1 \cdot 10^{-99}$
	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002969244.1	40	$8 \cdot 10^{-61}$
	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002960602.1	39	$3 \cdot 10^{-59}$
Pp1s275_68V6.3	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002991344.1	50	$5 \cdot 10^{-101}$
	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002969244.1	40	$7 \cdot 10^{-61}$
	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002960602.1	39	$2 \cdot 10^{-59}$
Pp1s465_28V6.1	PREDICTED: shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase-like [ <i>Eucalyptus grandis</i> ]	XP_010063596.1	37	$1 \cdot 10^{-82}$
	putative hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quinic hydroxycinnamoyl transferase [ <i>Hibiscus cannabinus</i> ]	AFN85668.1	36	$3 \cdot 10^{-77}$
	hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quinic hydroxycinnamoyl transferase [ <i>Platycodon grandiflorus</i> ]	AEM63675.1	34	$4 \cdot 10^{-77}$
Pp1s54_248V6.1	PREDICTED: shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase-like [ <i>Pyrus x bretschneideri</i> ]	XP_009354208.1	31	$2 \cdot 10^{-59}$
	hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic hydroxycinnamoyltransferase 1 [ <i>Pyrus x bretschneideri</i> ]	AFF57839.1	31	$3 \cdot 10^{-58}$
	PREDICTED: shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase-like [ <i>Malus domestica</i> ]	XP_008353756.1	31	$5 \cdot 10^{-58}$
Pp1s64_37V6.1	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002991344.1	54	$2 \cdot 10^{-160}$
	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002969244.1	41	$3 \cdot 10^{-104}$
	BAHD family acyltransferase, clade IV [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002960602.1	40	$8 \cdot 10^{-102}$



Pp1s97_287V6.1	BAHD family acyltransferase [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002973732.1	40	$2 \cdot 10^{-85}$
	BAHD acyltransferase [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002975782.1	39	$2 \cdot 10^{-81}$
	probable hydroxycinnamoyl transferase [ <i>Selaginella moellendorffii</i> ]	XP_002991534.1	35	$2 \cdot 10^{-78}$

Bei den Sequenzen handelt es sich um Pp1s15\_356V6.1 (HCT 1, 1302 bp), Pp1s15\_356V6.2 (HCT 2, 1149 bp), Pp1s22\_138V6.1 (HCT 3, 1233 bp), Pp1s465\_28V6.1 (HCT 4, 1365 bp), Pp1s54\_248V6.1 (HCT 5, 1509 bp). Für diese Sequenzen wurden Volllängenprimer für eine Amplifikation und anschließende Ligation in pRSET-C erstellt. Die Primer für HCT 1 und 4 hatten am 5'-Ende eine Schnittstelle für PvuII und am 3'-Ende für HindIII bekommen. Die Primer für HCT 2, 3 und 5 bekamen eine XhoI Schnittstelle am 5'-Ende und eine EcoRI Schnittstelle am 3'-Ende. Die PCR wurde zuerst mit gDNA durchgeführt. Hier konnten die ersten vier Sequenzen erhalten werden. HCT 4 besaß kein Intron, HCT 3 besaß zwei Introns, HCT 1 und 2 besaßen je ein Intron. Um eine Fusions-PCR zu vermeiden, wurde die PCR mit cDNA wiederholt, und bis auf HCT 3 konnten alle Sequenzen intronfrei amplifiziert werden (Abb. 87-89 sowie Tabelle 10). Die Analysen der Introns wurden mit dem NetPlantGene Server und der BLASTn-Funktion durchgeführt und anschließend manuell überprüft. Diese Sequenzen (HCT 1, 2, 4 und 5) wurden zuerst in den pDrive Vektor ligiert und vermehrt, bevor sie in pRSET umklontiert wurden.



**Abbildung 87** PCR von PpHCT 1 und 2 mit Volllängen-Primern, HCT1: Pp\_HCT1f und Pp\_HCT1r, HCT2: Pp\_HCT2f und Pp\_HCT2r (Konzentration der Primerlösung 10  $\mu$ M) und cDNA, Temperatur 50, 53 und 56  $^{\circ}$ C.

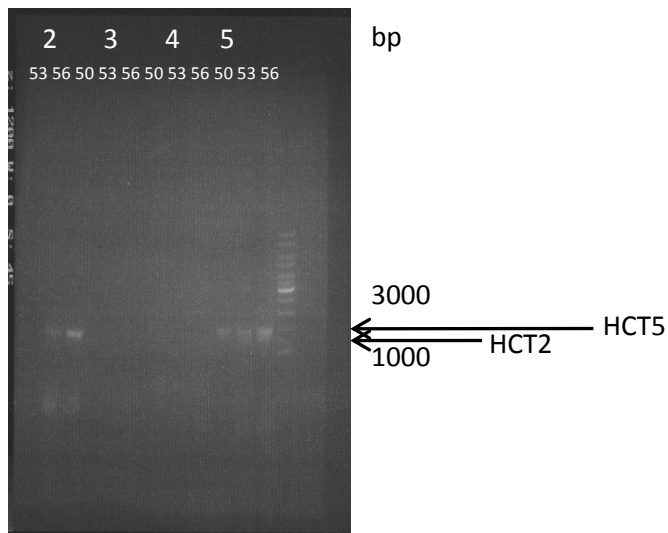


Abbildung 88 PCR von PpHCT 2, 3, 4 und 5 mit Volllängen-Primern HCT2: Pp\_HCT2f und Pp\_HCT2r, HCT3: Pp\_HCT3f und Pp\_HCT3r, HCT4: Pp\_HCT4f und Pp\_HCT4r und HCT5: Pp\_HCT5f und Pp\_HCT5r (Konzentration der Primerlösung 10  $\mu$ M) und cDNA, Temperatur 50, 53 und 56  $^{\circ}$ C.

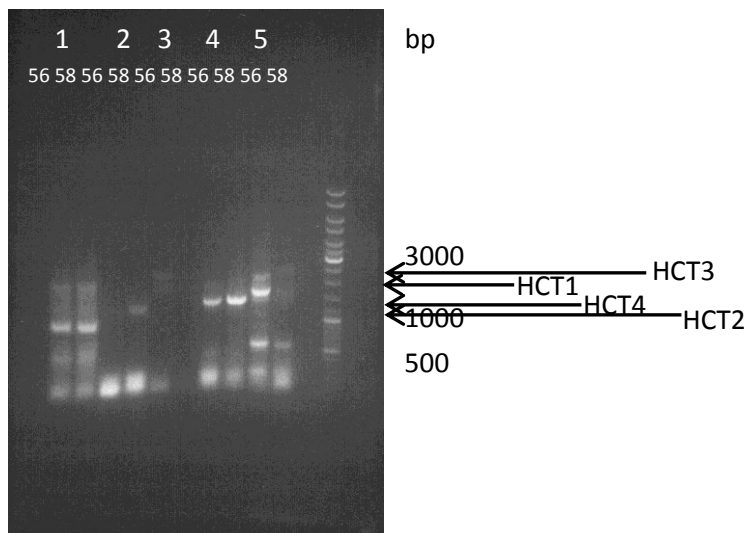


Abbildung 89 PCR von PpHCT 1, 2, 3, 4 und 5 mit Volllängen-Primern HCT1: Pp\_HCT1f und Pp\_HCT1r, HCT2: Pp\_HCT2f und Pp\_HCT2r, HCT3: Pp\_HCT3f und Pp\_HCT3r, HCT4: Pp\_HCT4f und Pp\_HCT4r und HCT5: Pp\_HCT5f und Pp\_HCT5r (Konzentration der Primerlösung 100  $\mu$ M Primerlösung) und gDNA, Temperatur 56 und 58  $^{\circ}$ C. Produkt bei HCT 5 war negativ.

Tabelle 10 Zusammenfassung der PCR-Experimente für intronfreie Sequenzen der PpHCTs 1-5.

HCT	1	2	3	4	5
Erwartete bp	1302	1149	1233	1365	1509
Erhaltene bp	~1300	~1200	-	~1400	~1500
Templat	cDNA	cDNA	-	gDNA	cDNA

### a) HCT 1

Die gDNA Sequenz (1725 bp) zeigt die Anwesenheit eines Introns (fett) an, welches 424 bp lang ist. Das Intron fängt nach dem Codon für Glutamin an, wird aber vermutlich kein echtes Q-Intron sein, da es zu nah am 5'-Ende der Sequenz liegt. Üblicherweise befinden sich Q-Introns etwa 17 Aminosäuren vor dem HXXXDG-Motiv. In dieser Sequenz fand eine Deletion statt, der Sequenzabschnitt müsste TTTGC heißen (unterstrichen). Durch diese Deletion kommt es zu einer Leserasterverschiebung und damit einem vorzeitigen Kettenabbruch. Ob diese Deletion während der PCR oder der Sequenzierung auftrat, ist unklar, es wurde keine Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet.

gDNA Sequenz der PpHCT1; Intronsequenzen sind fett dargestellt, die Stelle mit einer Sequenzdeletion ist unterstrichen:

```
ATGAAGGTCACCAAGTTGGAGGTGTCAACGGTATATCCGAGTGAGCGATGTGAACCGCACGTGATGTA
CCTGTCCGGTGCCGATCACATTGTCCGGCCTCGGCATGTCCCGATTTTTCTGTTTTATAGAGCTCGCG
AGGATGGCGAACAGGTATCTATATCTTTTACAAGCAGTGAATACCTTTGATTACGCCACTGTCCTTG
GTTTTGTGATGGAGCTCTATATTAACGTGCAGCTGAGTGTTGAGACATGTCACAAGCCTAATGGTTT
ATTTACAGCTGTCTGCTAGCTGAGTTGTTCTTGAGCTTGCTTCACACCTATTTTTTCCCTGCCTCACA
TCTAACCGGCCCTTCAATTTAGCCACCTGGGTAGTCGTTGATGAGATGCGGAAAACCTTGTTGGACAC
TGTTGGACACCTCTGTCTAGTTTAAATGTGCAATACGCTCCAAGAATAGTTTGTCATCCTTGAAACTG
GAGGAGGTATTCTCTCCGCAGAAGTCGTTACTATTTTCGATTGAGTATGTAAGTATTGAAGGCAAGGCTT
CATATCCAACCTCAGATAATTCTATGAACAGGTCATGCCAACTGACTTGTTGAAGAACTCAGTAGCGAA
CACGCTCTCGAAGTTCTACCCCATCGCAGGACGACTGCGTAAAGGAAGCGACAGGAAGCTAGAGATAG
TTCGCAACAACGCTGGAGTGGAGTTTGTGGAGGCAACAGTCGATGGCAGCTTAGACGAGTTTGATGGA
TTTAATCCTAAGTTGTTCTCGGAGTTGCTTGATCCAGTGCCCGTACCATTTGGCGAATCATTCACAGA
GTATCCCATCACGTATATCCAGGTGACTCGGTTTGCTTGCGGGGGCGTATCTCTCGTAATCACCATCA
ACCATGCTTGCGTTGACGGGCTTTCGGTGAATCAATTCCTGACGTCATGGTCTGAGGTGGCGAGGGGT
TTAGAGATGTGCAACCCGCCGGTTCACAACCGGACTTTGCTGAAAGTACATATAACTCCTGAGCCAGG
TTTCCGTCCCAAGGAGCTGAGATCTTTACGAATTGCTGCAGGCACTGCCCAAGCAGAACCTTATAGA
GTGCATGTTTTTCATTCACACCTGAACGGGTGTCGTTGTGAAAAAGAAGGCCATAGGAGGTGGAGAGC
AAGGAGCTTTCTCTACCTTTGAGGCCATCAGCGCTCACGTCTGGCGGTCTGTTACCAAAGCAAGAGGT
CTTGATTCTCAAGTTACAACCAGGCTTTTAAACCCTCTGGACATGCGTAGGCGTCTAAACCATACTCT
TCCCAAGGGTTACTTCGGTAATGCCTTATGCTTCGTTAGAGCCGAGGCAAAAGCCGGATACATCGTCA
ATAATTCTCTCTCGTACACTGCAAACCTGCATTTCGTAAAGCTGTGCAAGGATTTTCTGAAACGTACTAC
AGCAAGGTTATCGCCTTTGCGCAGACTCATGAAAATCCCCTTGTCATGAATGTGAATTGGGATGATAG
TGAGGGTTGTGATGTATGCGTATCAAGCTGGGTCCGATTTAACTTCATGAACCTGGATTTTGGCTCGG
GGAATCCTACCTTCTGCAGCCCCGGGAAAAACCCTTACGATGGTGCAATACGTATTCTCCCAACAGAC
AAGGGCAATGGCCACATTAACATTTTCCTGGCCCTGAAACCAGATCACATGAAGAACTCATTTTCGGA
TGCAGAGTTTCTCCTTGATGACTGA
```

Die Deletion T1056 ist in der cDNA Sequenz nicht mehr zu finden (unterstrichen). Diese wurde mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion amplifiziert. Damit konnte das Gen in den Expressionvektor kloniert werden (Abb. 90 und 91). Die Sequenz ist 1302 bp lang.

cDNA-Sequenz der PpHCT1:

```
ATGAAGGTCACCAAGTTGGAGGTGTCAACGGTATATCCGAGTGAGCGATGTGAACCGCACGTGATGTA
CCTGTCCGGTGCCGATCACATTGTCCGGCCTCGGCATGTCCCGATTTTTCTGTTTTATAGAGCTCGCG
AGGATGGCGAACAGGTCATGCCAACTGACTTGTTGAAGAACTCAGTAGCGAACACGCTCTCGAAGTTC
TACCCCATCGCAGGACGACTGCGTAAAGGAAGCGACGGGAAGCTAGAGATAGTTTGAACAACGCTGG
AGTGAGTTTGTGGAGGCAACAGTCGATGGCAGCTTAGACGAGTTTGATGGATTTAATCCTAAGTTGT
TCTCGGAGTTGCTTGATCCAGTGCCCGTACCATTTGGCGAATCATTCACAGAGTATCCCATCACGTAT
```

ATCCAGGTGACTCGGTTTGCTTGCGGGGGCGTATCTCTCGTAATCACCATCAACCATGCTTGCGTTGA  
 CGGGCTTTCGGTGAATCAATTCCTGACGTCATGGTCTGAGGTGGCGAGGGGTTTAGAGATGTGCAACC  
 CGCCGGTTCACAACCGGACTTTGCTGAAAGTACATATAACTCCTGAGCCAGGTTTCCGTCCCAAGGAG  
 CTGAGATCTCTTACGAATTTGCTGCAGGCACTGCCCCAAGCAGAACCTTATAGAGTGCATGTTTTATT  
 CACACCTGAACGGGTCATGCTTGTGAAAAAGAAGGCCATAGGAGGTGGAGAGCAAGGAGCTTCTCTA  
 CCTTTGAGGCCATCAGCGCTCACGTCTGGCGGTCTGTTACCAAAGCAAGAGGTCTTGATTCTCAAGTT  
 ACAACCAGGCTTTTAACCCCTCTGGACATGCGTAGGCGTCTAAACCATACTCTTCCCAAGGGTTACTT  
 CGGTAATGCCATATGCTTCGTTAGAGCCGAGGCAAAAGCCGGATACATCGTCAATAATTCTCTCTCGT  
 AACTGCAAACTGCATTCGTAAAGCTGTCTGAAGGATTTTCTGAAACGTACTACAGCAAGGTTATCGCC  
 TTTGCGCAGACTCATGAAAATCCCCCTTGTCTATGAATGTGAATTGGGATGATAGTGAGGGTTGTGATGT  
 ATGCGTATCAAGCTGGGTCCGATTTAACTTCATGAACCTGGATTTTGGCTCGGGGAATCCTACCTTCT  
 GCAGCCCCGGGAAAAACCCTTACGATGGTGAATACGTATTCTCCCAACAGACAAGGGCAATGGCCAC  
 ATTAACATTTTCTGGCCCTGAAACCAGATCACATGAAGAACTCATTTTCGGATGCAGAGTTTCTCCT  
 TGATGACTGA

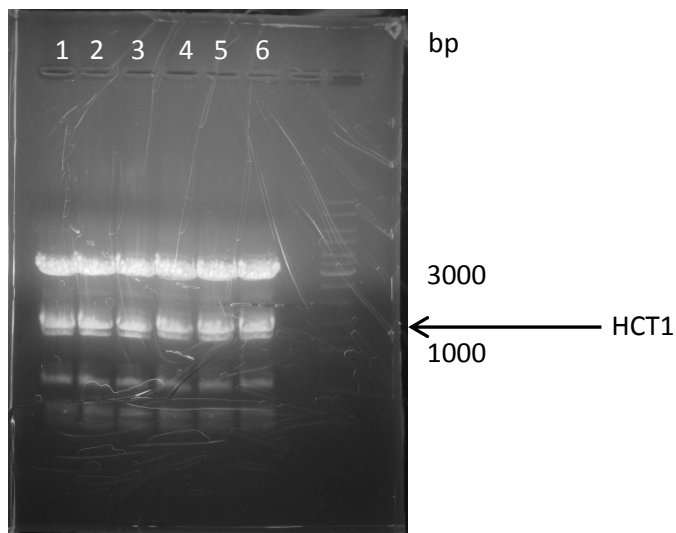


Abbildung 90 Doppelverdau von pDrive[PpHCT1] mit PvuII und HindIII, *E. coli* Klone 1-6.

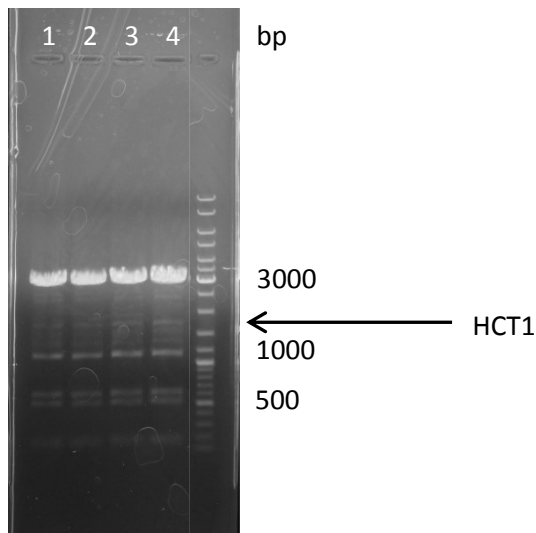


Abbildung 91 Doppelverdau von pRSET-C[PpHCT1] mit PvuII und HindIII, *E. coli* Klone 1-4.

Die Proteinsequenz ist 433 Aminosäuren lang und besitzt ein Molekulargewicht von 48,3 kDa. Die konservierten Bereiche konnten identifiziert werden, das C-terminal gelegene DFGWG ist deutlich abgeändert. Der Pfeil markiert die Stelle, an der in der DNA-Sequenz das Intron eingefügt war.

Aminosäuresequenz der PpHCT1:

MKVTKLEVSTVYPSERCPEHVMYLSGADHIVRPRHVPIFLFYRAREDEGEQ↓VMPTDLLKNSVANTLSK  
FYPIAGRLRKSGDGKLEIVCENNAGVEFVEATVDGSLDEFDGFNPKLFSELLDPVPVPFGESEFTEYPIT  
YIQVTRFACGGVSLVITINHACVDGLSVNQFLTSWSEVARGLEMSNPPVHNRTLLKVHITPEPGFRPK  
ELRSLTNLLQALPKQNLIEMFSFTPERVMLVKKKAIGGGEQGAFFSTFEAISAHVWRSVTKARGLDSQ  
VTTRLLTPLDMRRRLNHTLPKGYFGNAICFVRAEAKAGYIVNNSLSYTANCIRKAVEGFSETYYSKVI  
AFAQTHENPLVMNVNWDDSEGCDVCVSSWVRFNFMNLDFGSGNPTFCSPGKNPYDGAIRILPTDKGNG  
HINIFLALKPDHMKKLISDAEFLDD-

## b) HCT 2

Die gDNA Sequenz von HCT 2 (1265 bp) besitzt ein Intron, welches allerdings nur 116 bp lang ist und sich dort befindet, wo Q-Introns beschrieben wurden (17 Aminosäuren vor dem HXXXDG Motiv):

ATGCCAACTGACTTGTGAAGAACTCGGTAGCGAACACGCTCTCGAAGTTCTACCCCATCGCAGGACG  
ACTGCGTAAAGGAGGCGACGGGAAGCTAGAGATAGTTTGCAACAACGCTGGAGTGGAGTTTGTGGAGG  
CAACAGTCGATGGCAGCTTAGACGAGTTTGATGGATTAAATCCTAAGTTGTCTCGGAGTTGCTTGAT  
CCAGTGCCCGTACCATTGGCGAATCATTCACAGAGTATCCCATCACGTATATCCAGGTGGGACACAT  
**TTCCGTGGACTCTGCTTCCACTTGTTTCTTCTGTTTTGGTAAGTGAATTCCTTCTCGCTTGATAAA**  
**TTATTATCATGCATTCTCTAATATGTACGCTGATCAGGTGACTCGGTTTGCTTGCGGGGGCGTATCTC**  
TCGTAATCACCATCAACCATGCTTGCGTTGACGGGCTTTTCGGTGAATCAATTCCTGACGTCATGGTCT  
GAGGTGGCGAGGGGTTTAGAGATGTCGAACCCGCCGTTTCAACCGGACTTTGCTGAAAGTACATAT  
AACTCCTGAGCCAGGTTTCCGTCCCAAGGAGCTGAGATCTCTTACGAATTTGCTGCAGGCACTGCCCA  
AGCAGAACCTTATAGAGTGCATGTTTTTCATTACACCTGAACGGGTCATGCTTGTGAAAAAGAAGGCC  
ATAGGAGGTGGAGAGCAAGGAGCTTTCTCTACCTTTGAGGCCATCAGCGCTCACGTCTGGCGGTCTGT  
TACCAAAGCAAGAGGTCTTGATTCTCAAGTTACAACCAGGCTTTTAACCCCTCTGGACATGCGTAGGC  
GTCTAAACCATACTCTTCCCAAGGGTTACTTCGGTAATGCCATATGCTTCGTTAGAGCCGAGGCAAAA  
GCCGGATACATCGTCAATAATTCTCTCTCGTACACTGCAAACGATTCGTAAAGCTGTGCAAGGATT  
TTCTGAAACGTACTACAGCAAGGTTATCGCCTTTGCGCAGACTCATGAAAATCCCTTGTCTATGAATG  
TGAATTGGGATGATAGTGAGGGTGTGATGTATGCGTATCAAGCTGGGTCCGATTTAACTTCATGAAC  
CTGGATTTTGGCTCGGGGAATCCTACCTTCTGCAGCCCCGGGAAAAACCCTTACGATGGTGCAATACG

TATTCTCCCAACAGACAAGGGCAATGGCCACATTAACATTTTCCTGGCCCTGAAACCAGATCACATGA  
AGAAACTCATTTTCGGATGCAGAGTTTCTCCTTGATGACTGA

Die codierende Sequenz besitzt 1149 Basen (Abb. 92 und 93), welches für typische BAHD-Acyltransferasen zu kurz ist. Im Vergleich zu der Sequenz Pp1s15\_356V6.2 der cosmos Datenbank besitzt sie eine Punktmutation auf der Position 988. Hier liegt deshalb ein Isoleucin- und kein Threonin-Codon vor (fett).

#### cDNA Sequenz der PpHCT2:

ATGCCAACTGACTTGTTGAAGAACTCAGTAGCGAACACGCTCTCGAAGTTCTACCCCATCGCAGGACG  
ACTGCGTAAAGGAAGCGACGGGAAGCTAGAGATAGTTTGCAACAACGCTGGAGTGGAGTTTGTGGAGG  
CAACAGTCGATGGCAGCTTAGACGAGTTTGATGGATTTAATCCTAAGTTGTTCTCGGAGTTGCTTGAT  
CCAGTGCCCGTACCATTTGGCGAATCATTACAGAGTATCCCATCACGTATATCCAGGTGACTCGGTT  
TGCTTGCGGGGGCGTATCTCTCGTAATCACCATCAACCATGCTTGCGTTGACGGGCTTTTCGGTGAATC  
AATTCCTGACGTCATGGTCTGAGGTGGCGAGGGGTTTAGAGATGTCGAACCCGCCGGTTCACAACCGG  
ACTTTGCTGAAAGTACATATAACTCCTGAGCCAGGTTTCCGTCCCAAGGAGCTGAGATCTCTTACGAA  
TTTGCTGCAGGCACTGCCAAGCAGAACCTTATAGAGTGCATGTTTTTCATTCACACCTGAACGGGTCA  
TGCTTGTGAAAAAGAAGGCCATAGGAGGTGGAGAGCAAGGAGCCTTCTCTACCTTTGAGGCCATCAGC  
GCTCACGTCTGGCGGTCTGTTACCAAAGCAAGAGGTCTTGATTCTCAAGTTACAACCAGGCTTTTAAAC  
CCCTCTGGACATGCGTAGGCGTCTAAACCATACTCTTCCCAAGGGTTACTTCGGTAATGCCATATGCT  
TCGTTAGAGCCGAGGCAAAAGCCGGATACATCGTCAATAATTCTCTCTCGTACACTGCAAACTGCATT  
CGTAAAGCTGTGGAAGGATTTTCTGAAACGTACTACAGCAAGGTTATCGCCTTTGCGCAGACTCATGA  
AAATCCCCTTGTTCATGAATGTGAATTGGGATGATAGTGAGGGTTGTGATGTATGCGTATCAAGCTGGG  
TCCGATTTAACTTCATGAACCTGGATTTTGGCTCGGGGAATCCTATCTTCTGCAGCCCCGGGAAAAAC  
CCTTACGATGGTGCAATACGTATTCTCCCAACAGACAAGGGCAATGGCCACATTAACATTTTCCTGGC  
CCTGAAACCAGATCACATGAAGAACTCATTTTCGGATGCAGAGTTTCTCCTTGATGACTGA

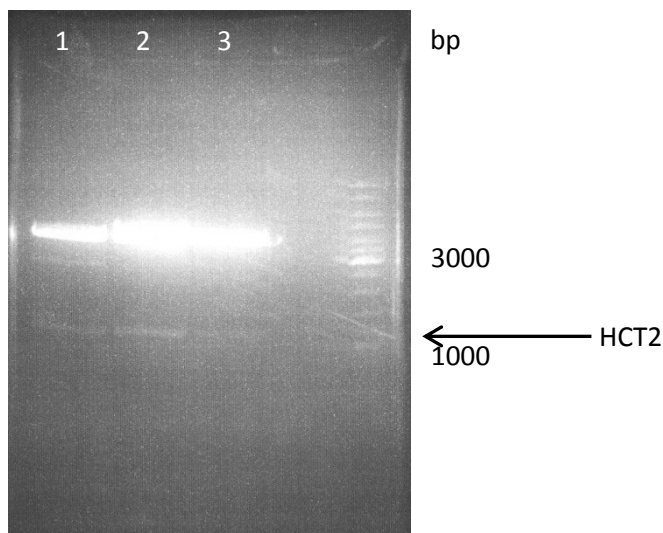


Abbildung 92 Doppelverdau von pDrive[PpHCT2] mit XhoI und EcoRI, *E. coli* Klone 1-3.

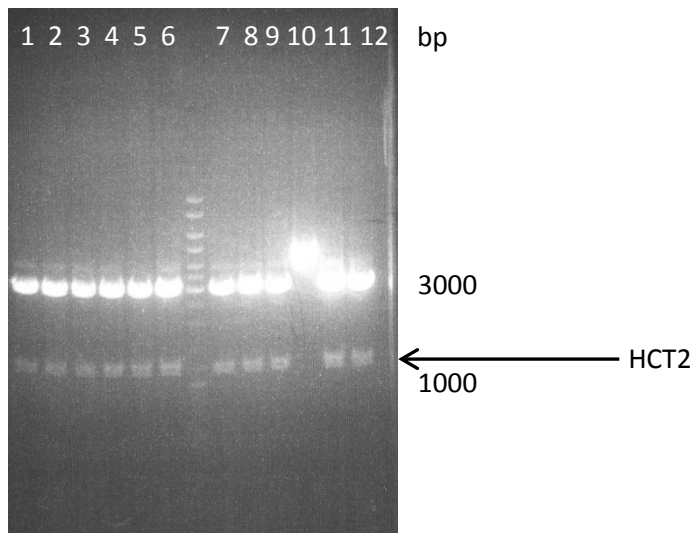


Abbildung 93 Doppelverdau von pRSET-C[PpHCT2] mit XhoI und EcoRI, *E. coli* Klone 1-12 (10 war nicht korrekt).

Die Proteinsequenz besitzt mit einem Molekulargewicht von 42,3 kDa 382 Aminosäuren, der Pfeil markiert die Stelle, an der in der DNA-Sequenz das Intron eingefügt war:

MPTDLLKNSVANTLSKFYPIAGRLRKGS DGKLEIVC NNAGVEFVEATVDGSLDEFDGFNPKLFSELLD  
 PVPVPFGESFTEYPITYIQ↓VTRFACGGVSLVITINHACVDGLSVNQFLT SWSEVARGLEMSNPPVHN  
 RTLLKVHITPEPGFRPKELRSLTNLLQALPKQNLIECMFSFTPERVMLVKKKAIGGGEQGAFSTFEAI  
 SAHVWRSVTKARGLDSQVTT RLLTPLDMRRRLNHTLPKGYFGNAICFVRAEAKAGYIVNNSLSYTANC  
 IRKAVEGFSETYYSKVIAFAQTHENPLVMNVNWDDSEGCDVCVSSWVRFNFMNLDFGSGNP~~I~~FCSPGK  
 NPYDGAIRILPTDKGN GHINIFLALKPDHMKKLISDAEFLDD-

Interessant ist hier das Proteinalignment von PpHCT 1 und 2. Beide codierende Sequenzen sind zu weiten Teilen identisch und scheinen denselben Ursprung zu haben. Sie unterscheiden sich zum einen in der Länge, da HCT 1 51 Aminosäuren länger ist. Diese Aminosäuren finden sich vor dem Intron, das heißt, HCT 2 beginnt mit dem ersten Startcodon auf Exon 2 von HCT 1. Die Basensequenz des 2. Exons von HCT 1 ist genauso lang wie die cDNA von HCT 2, nämlich 1149 bp. Deshalb sind die konservierten Bereich auch identisch (unterstrichen) Der andere Unterschied betrifft das Intron. Es findet sich bei HCT 2 ein Q-Intron, aber es handelt sich um eine ganz andere intronische Sequenz als bei HCT 1. Dies könnte wiederum mehrere Ursachen haben. Rensing et al. beschrieben eine Genomduplikation bei *Physcomitrella patens* (Rensing et al. 2007). Dies könnte die Ursache der zwei identischen CDS sein. Die Introns wiederum können von mobilen Elementen stammen, wie sie vielfach seit dieser Genomduplikation auftreten könnten, etwa durch horizontalen Gentransfer von anderen Organismen und durch Indel-Ereignisse. Spezifische Genduplikationen von BAHD-Acyltransferasen wurden z.B. in der Pappel nachgewiesen (Tuominen et al. 2011). Auch Marion Sander hat in ihrer Dissertation in *Glechoma hederacea* jeweils zwei Genkopien von HSTs, putativen HQTs und RAS mit unterschiedlichen Proteinlängen gefunden. Bei der RAS war allerdings nur eine von zwei Kopien aktiv, während bei der HST beide aktiv waren und bei der putativen HQT keine (Sander 2010).

Proteinalignment der Sequenzen PpHCT 1 und 2:

```
Pp_HCT_1      MKVTKLEVSTVYPSE RCEPHVMYLSGADHIVRPRHVPIFLFYRARE DGEQVMPTDLLKNS
Pp_HCT_2      -----MPTDLLKNS
                                     *****
```

Pp_HCT_1	VANTLSKFYPIAGRRLRKGSDGKLEIVCNNAGVEFVEATVDGSLDEFDGFNPKLFSELLDP
Pp_HCT_2	VANTLSKFYPIAGRRLRKGSDGKLEIVCNNAGVEFVEATVDGSLDEFDGFNPKLFSELLDP
	*****
Pp_HCT_1	VPVPFGESFTEYPITYIQVTRFACGGVSLVITINHACVDGLSVNQFLTSWSEVARGLEMS
Pp_HCT_2	VPVPFGESFTEYPITYIQVTRFACGGVSLVITINHACVDGLSVNQFLTSWSEVARGLEMS
	*****
Pp_HCT_1	NPPVHNRTLLKVHITPEPGFRPKELRSLTNLLQALPKQNLIECMFSFTPERVMLVKKKAI
Pp_HCT_2	NPPVHNRTLLKVHITPEPGFRPKELRSLTNLLQALPKQNLIECMFSFTPERVMLVKKKAI
	*****
Pp_HCT_1	GGGEQGAFFSTFEAISAHVWRSVTKARGLDSQVTTTRLLTPLDMRRRLNHTLPKGYFGNAIC
Pp_HCT_2	GGGEQGAFFSTFEAISAHVWRSVTKARGLDSQVTTTRLLTPLDMRRRLNHTLPKGYFGNAIC
	*****
Pp_HCT_1	FVRAEAKAGYIVNNSLSYTANCIRKAVEGFSETYYSKVIAFAQTHENPLVMNVNWDDESEG
Pp_HCT_2	FVRAEAKAGYIVNNSLSYTANCIRKAVEGFSETYYSKVIAFAQTHENPLVMNVNWDDESEG
	*****
Pp_HCT_1	CDVCVSSWVRNFNFMNLDFGSGNPTFCSPGKNPYDGAIRILPTDKGNHINIFLALKPDHM
Pp_HCT_2	CDVCVSSWVRNFNFMNLDFGSGNPTFCSPGKNPYDGAIRILPTDKGNHINIFLALKPDHM
	*****
Pp_HCT_1	KKLISDAEFLDD
Pp_HCT_2	KKLISDAEFLDD
	*****

### c) HCT 3

Die gDNA-Sequenz von HCT 3 besitzt zwei Introns: Ein großes (632 bp) Q-Intron und ein zweites kleineres Intron (107 bp, beide fett). Die gDNA Sequenz ist 1972 bp lang.

ATGGCCGCCGCAAGTCAAGTTCAGTTGGATGTGACCATTAGGAAGCAGTCCATGGTGCGTCCCAGTGA  
ACCGACACCAGAGAGAATACTCTGGAAGTTCAGGTTTGGACCTTGTCATTCTCTAGAATCCACACGCAGA  
GCGTGTATTTTTACAACAACAATGATGGAAGTGACGATTTCTTGAACCATGAGAAGCTTGCGGAGGCG  
CTGGGCAAGACATTGGTGCCATTTTACCCCATGGCTGGCCGACTGAAACGGGGGAAGGAGGAAGAGT  
CGAGATTAAGTGTAAATGGAGAAGGAGTGCTTCTTGTCGAAGCTGAAGCAGATGCTAAGATTACTGATT  
TCGGCGAGTTTGCTCCAGACCCCGTTTTTCGCCACCTCGTTTCTCAAGTGGACTACTCCCAAGAGATA  
TCTTCGTTTTCCGCTTCTGGTTCTCCAG**GTTTGAGACTTCCTTCGTCGTCGCTACTTTGTGGGTGTG**  
**GGTGCGAGATTTTTAAGCTCTAACACACCATAAAATTTTCGTTTCAGATCACGTTCTTCAAATGCGGTG**  
**GTGCGTCGCTAGGAGTGGGCATGCAGCATCACGTTGCAGATGGCATGTCTGGCCTTCACTGCGTCAAC**  
**ACATGGTCGGAGATGGCGAGAGGGATCCCTCTCAAAGTTAAACCGTTTATTGACCGCACGTTGTTGAA**  
**GGCGAACTCCCCTCCTAGACCCATGTTTCCTCACATTGAGTACCAACCTCCGCCAGATTAATGAAAC**  
**CTGAGAATTCTAAGTCAATGGTAATGGTCATTCAAACGGCCATTCAAATGGTCTCGCAAATGGACAT**  
**GCAAATGTTTACGCCAATGGACTTGCTAATGGTCACGCAAACGGCCATTCAAAGGCCACGCGAATAA**  
**TTATTCCAATGGTCACCACACCAACGGAATGGAGATTACGAATGGAGCCTTTCACACAAACGGGAATG**  
**GGAATGGTGTGCTCAACGATTCTCATGTTGCAAACAGGAAGAGCAACGGAGCTCATATGGAGAACGGC**  
**AACGGCAATGGTAACGGAGACTTCAACGAGAACCCATGAAAAACNAG**GNCACTGGAAATGGCAACAGT  
GTCTGTGCTGGAGGCGGTACAATCATGCTAATGGCAACGAAAACCAAAGTGCAGTGCAGTTGAACGT  
CAAGAAGATGACGAATGGCGTTCACAATAGCAATGGTTCCACCAACGAAGAGGCTAAAGACGAGGACC  
TGCCCATGGCTGTGCGTGTCTTCCGATTACCAAAGAGCAATTGGCCACTTTGAAACGAATGGCAGTG  
GAGGAGAAGGCCGATGTGACCTTCAGCAGCTACGAAATGCTGTCAGGCCACATCTGGAAATGCATCAC  
GCAAGCTCGGAAGTTGGCAGAGTCTCAAGAAACCAAGCTTTTCGTCGCAACCGACGGCCGGTTCGCGGC  
TCAATCCGCCACTTCCGAAGGGCTACTTCGGCAATGTGATCTTCACTTGCACTCCTATTGCAACGGCT  
GGGGAGTTGGTATCAAATCCAATAACATATGCTGCGAGAAAG**GTAAGCATCACTCATTCAATCCCGT**



**CATGTTTTGGTTTCTTGAGCGGATGCACCTTGTTGCTCAGTTTGATCGCAACCCATGTCTCAGAATCA  
TTGTCTGCCACAGATTCATGATTCGTTGGCGAGAATGAATGATGAATATTTGCGATCTGCACTTGACT  
ACCTGGAGACGCAAGAGGATATCAGCAAACCTCGTCCGCGGCGCACACCACTTCAATTCTCCAAACCTG  
GGGATCACCTCCTGGGCGCGAATGCCCACTTACGACTGCGATTTTGGCTGGGGGAGACCGATTTTCAT  
GGGACCAGCTACAATAGCCTATGAAGGATTGGTGTATGTGTTAGCCAGCCCTGTCAACGACGGAAGCT  
TGAGCCTGTCTTGGGCTTGAGATCCGACCACATGGACACATTTGCCAAACTAGTGGCATCCTTCTAA**

Da diese Sequenz nicht als intronfreie Volllänge amplifiziert werden konnte, sind die Untersuchungen der codierenden Gensequenz und der Proteinsequenz auf theoretischer Basis. Am Übergang zwischen dem ersten Intron und dem zweiten Exon konnten zwei Basen nicht eindeutig sequenziert werden. Für das zweite Nukleotid bedeutet dies, dass das Codon für Ala, Val, Gly, Asp und Glu abgedeckt werden kann. Die Gensequenz wäre 1233 bp lang, das unbekannte Nukleotid befindet sich an Position 437 (N, fett).

#### Putative cDNA-Sequenz von PpHCT3:

ATGGCCGCCGCAAGTCAAGTTCAGTTGGATGTGACCATTAGGAAGCAGTCCATGGTGCGTCCCAGTGA  
ACCGACACCAGAGAGAATACTCTGGAACCTCAGGTTTGGACCTTGTCATTCTCTAGAATCCACACGCAGA  
GCGTGATTTTTTACAACAACAATGATGGAAGTGACGATTTCTTGAACCATGAGAAGCTTGCGGAGGCG  
CTGGGCAAGACATTGGTGCCATTTTACCCCATGGCTGGCCGACTGAAACGGGGGGAAGGAGGAAGAGT  
CGAGATTAAGTGAATGGAGAAGGAGTGCTTCTTGTCGAAGCTGAAGCAGATGCTAAGATTACTGATT  
TCGGCGAGTTTGCTCCAGACCCCGTTTTTCGCCACCTCGTTTCTCAAGTGGACTACTCCCAAGAGATA  
TCTTCGTTTCCGCTTCTGGTTCTCCAGG**N**CAGTGGAATGGCAACAGTGTCTGTGCTGGAGGCGGTCA  
CAATCATGCTAATGGCAACGAAAACCAAAGTGCAGTGCAGTTGAACGTCAAGAAGATGACGAATGGCG  
TTCACAATAGCAATGGTTCCACCAACGAAGAGGCTAAAGACGAGGACCTGCCCATGGCTGTGCGTGTG  
TTCCGATTACCAAAGAGCAATTGGCCACTTTGAAACGAATGGCAGTGGAGGAGAAGGCCGATGTGAC  
CTTCAGCAGCTACGAAATGCTGTGTCAGGCCACATCTGGAAATGCATCACGCAAGCTCGGAAGTTGGCAG  
AGTCTCAAGAAACCAAGCTTTTCGTGCGCAACCGACGGCCGGTTCGCGGCTCAATCCGCCACTTCCGAAG  
GGCTACTTCGGCAATGTGATCTTCACTTGCACTCCTATTGCAACGGCTGGGGAGTTGGTATCAAATCC  
AATAACATATGCTGCGAGAAAGATTCATGATTCGTTGGCGAGAATGAATGATGAATATTTGCGATCTG  
CACTTGACTACCTGGAGACGCAAGAGGATATCAGCAAACCTCGTCCGCGGCGCACACCACTTCAATTCT  
CCAAACCTGGGGATCACCTCCTGGGCGCGAATGCCCACTTACGACTGCGATTTTGGCTGGGGGAGACC  
GATTTTCATGGGACCAGCTACAATAGCCTATGAAGGATTGGTGTATGTGTTAGCCAGCCCTGTCAACG  
ACGGAAGCTTGAGCCTGTCTTGGGCTTGAGATCCGACCACATGGACACATTTGCCAAACTAGTGGCA  
TCCTTCTAA

Die konservierten Bereiche sind vorhanden, das HXXXDG Motiv ist erneut abgewandelt, statt des Aspartats findet sich hier ein Asparagin (siehe auch HCT 3 aus *Anthoceros agrestis* (Abschnitt VI.B.2.c)). Es können hier noch keine Aussagen zu möglichen Aktivitätsänderungen durch diese Veränderung besprochen werden. Das Protein ist 410 Aminosäuren lang. Da die Aminosäure an Position 146 nicht festgelegt werden kann (X, fett) kann das Molekulargewicht mit 45 kDa nur angenähert werden.

#### Aminosäuresequenz von PpHCT3:

MAAASQVQLDVTIRKQSMVRPSEPTPERILWNSGLDLVIPRIHTQSVYFYNNNDGSDDFLNHEKLAEA  
LGKTLVPFYPMAGRLKRGEGRVEINCNGEVLLVEAEADAKITDFGEFAPDPRFRHLVPQVDYSQEI  
SSFPLLVLQ↓**X**SGNGNSVCAGGGHNNHANGNENQSAVQLNVKKMTNGVHNSNGSTNEEAKDEDLPM AVR  
VFRFTKEQLATLKRMAVEEEKADVTFSSYEMLSGHIWKCIQTARKLAESQETKLFVATDGRSRLNPPLP  
KGYFGNVIFTCTPIATAGELVSNPITYAARK↓IHDSLARMNDEYLRSLDYLETQEDISKLVIRGAHHF

NSPNLGITSWARMPTYDCDFGWGRPIFMGPATIAEGLVYVLASPVNDGSLSLSLGLRSDHMDTFAKL  
VASF-

Der Blick auf das Alignment mit der Proteinsequenz Pp1s22\_22\_138v6.1 der cosmos Datenbank zeigt an der Stelle ein Isoleucin, das dazugehörige Codon lautet ATC. Es könnte sich also bei dem unbekannten Nukleotid der HCT 3 um ein Thymin handeln sodass ein Valin (GTC) codiert wird. Das darauffolgende Codon wird in der Datenbank mit ACT (Threonin) angegeben, hier findet man jedoch ein AGT (Serin). Es könnten sich bei beiden Fällen um Punktmutationen handeln, die jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf Enzymstruktur und -Aktivität haben. Da die Qualität einer Sequenzierung mit zunehmendem Abstand von der Primerbindestelle wieder abnimmt und sich dieser fragliche Bereich in der Mitte einer langen Sequenz befindet, bedarf eine weitere Sequenzierung eines eigenen Sequenzierprimers, der so gestaltet werden muss, dass diese interessante Stelle in den Bereich guter Auflösungen des Sequenzierchromatogramms liegt.

Proteinalignment von HCT3 mit der Sequenz PP1s22\_138:

HCT_3 Pp1s22_138V6.1	MAAASQVQLDVTIRKQSMVRPSEPTPERILWNSGLDLVIPRIHTQSVYFYNNNDGSDDFL MAAASQVQLDVTIRKQSMVRPSEPTPERILWNSGLDLVIPRIHTQSVYFYNNNDGSDDFL *****
HCT_3 Pp1s22_138V6.1	NHEKLAEALGKTLVPFYPMAGRLKRGEGRVEINCNGEGVLLVEAEADAKITDFGEFAPD NHEKLAEALGKTLVPFYPMAGRLKRGEGRVEINCNGEGVLLVEAEADAKITDFGEFAPD *****
HCT_3 Pp1s22_138V6.1	PRFRHLVPQVDYSQEISSFPLLVLQXSGNGNSVCAGGGHNHANGNENQSAVQLNVKKMTN PRFRHLVPQVDYSQEISSFPLLVLQITGNGNSVCAGGGHNHANGNENQSAVQLNVKKMTN ***** :
HCT_3 Pp1s22_138V6.1	GVHNSNGSTNEEAKDEDLPMAVRVFRFTKEQLATLKRMAVEEEKADVTFSSYEMLSGHIWK GVHNSNGSTNEEAKDEDLPMAVRVFRFTKEQLATLKRMAVEEEKADVTFSSYEMLSGHIWK *****
HCT_3 Pp1s22_138V6.1	CITQARKLAESQETKLFVATDGRSRLNPPLPKGYFGNVIFTCTPIATAGELVSNPITYAA CITQARKLAESQETKLFVATDGRSRLNPPLPKGYFGNVIFTCTPIATAGELVSNPITYAA *****
HCT_3 Pp1s22_138V6.1	RKIHDSLARMNDEYLRSDYLETQEDISKLVRAHHFNSPNLGITSWARMPTYDCDFGW RKIHDSLARMNDEYLRSDYLETQEDISKLVRAHHFNSPNLGITSWARMPTYDCDFGW *****
HCT_3 Pp1s22_138V6.1	GRPIFMGPATIAEGLVYVLASPVNDGSLSLSLGLRSDHMDTFAKLVSF GRPIFMGPATIAEGLVYVLASPVNDGSLSLSLGLRSDHMDTFAKLVSF *****

#### d) HCT 4

HCT 4 besaß kein Intron, deshalb wurde die Amplifizierung mit gDNA als Templat durchgeführt. Es gab zwei Punktmutationen (fett), die zu kleinen Veränderungen im Vergleich zu der cosmos Sequenz Pp1s465\_28V6.1 führen. Diese wurden in der gDNA Sequenz gefunden. Die cDNA Sequenz lieferte hier keine eindeutige Base (N, fett). Im ersten Fall findet sich mit einem G im Codon ein Alanin statt einem Threonin in der Proteinsequenz und im zweiten Fall ein Arginin statt einem Lysin (fett).

Sequenz von PpHCT4, Enzym ohne Lesekorrekurfunktion:

ATGGGGATCGATGAGGTCACGGAATCGGTTCTCGAATGCGCATCATATCTTCAAAGACGTCCATTGT  
GTACCTGGAATTTCCCGCGGAGCTCCATGTGTTATCCTGCTCCATCTGCGATAACTTTGTCCGTCCCA  
CCCATGTGCGCACTCTGTATCTCTACCGAGAGACTTCTCCCGGTGCCAACGAGCATGTGACAACCAGG  
CTGAAAGCAGCCCTAGCCAAGCTCTTGGTGGTGTTTTACCCCATGGCAGGGCGGGTCCGGCGAGCGGA  
GGGGAACATCGGGTACGAAATCCACTGTAACAATAAGGGAGTGGTGTGGGTCGACGCCGAAGTGGATG

GTACCATCGACGACTTCGAGAACTTCCAGCCAAATTACGTCTTCAACAAGTTATTAGTGCCACGGTG  
 GACTACTCCGTGAGCATCGAATTCCAGCCCGTGAGATCATTCAAATCACCAAGTTTCAATGCGGCGG  
 CTTTCGCGCTGGGAATGGCCAACCATCACACCGTCGCCGACGGCATCTCTGCTCACAACCTCATGGCGT  
 CGTGACAGAACTGGTCCGCGGGGAGCAGATCTCGCAACTGCCTAACTACGACCACCACCTGCTCTCT  
 TCAATGGGACGTGCCAAGCCCGACACTTGTCCCAGAGAGCTCCGGCTCCGACCCAAGGTAATGGAGCC  
 GCCGCCAACGCGCAAAATGGTGGAGAGGTTGTTACCTTCACTCCCGAGATGCTGAAGAAGATCAAGG  
 CCGAGGCTCTAGTGACGGAAGTTTGGGCTCATTACCACTTTTCGAAAGCCTGTCTGCGCACCTCTTTA  
 GAGCGGTAATCCGAGCCAAGGGCTGCGCTGATTTCGGAGGAAGCCAGATTTTTTACC**G**CTATGGACGCC  
 AGAAAGCGAATCAAGCCCAATTTGCCGGAGGGCTACTTCGGCAACGCGATCATCTTCACATGCATGCC  
 TGCGAAGGTCTGCGACATCCTGGAGAG**G**GCCTCTGTCTGTTCTCAGCGCAACTGGTTCGAGAAAGTGTGC  
 TGAAGATGACGGACGAGTATGTAAAATCTTCCTGGGCGTGGTTCGAGGCGCAGGAGCATCTCACCATG  
 AGCTCCATCAACCTCATGGGTAAACGACATCTCCTCCGCGGGTGGTTCGGATGCCATTCTATGATAC  
 CGACTTCGGGTTTCGGGAAGCCAGTGTTTGCAGGACCTGCTGACAATCCCTATAATGGCTGCATTCTGA  
 TGCTGCCCAGTCACATTGGACCTAAAGCTATCAATGTATTTCATGGCGTTGTGGAGAGAAGACATGGAG  
 AGGTTGATGGCAGACAGCGATTTTCTCGTGACCAGCCAAGTGAATCGATCCAATATTTCTGTGCAGA  
 GTAG

Codierende Sequenz ist 1365 bp lang, Enzym mit Lesekorrekturefunktion (Abb. 94 und 95):

ATGGGGATCGATGAGGTCACGGAATCGGTTCTCGAATGCGCATCATATCTTCAAAGACGTCCATTGT  
 GTACCTGGAATTTCCCGCGGAGCTCCATGTGTTATCCTGCTCCATCTGCGATAACTTTGTCCGTCCCA  
 CCCATGTGCGCACTCTGTATCTCTACCGAGAGACTTCTCCCGGTGCCAACGAGCATGTGACAACCAGG  
 CTGAAAGCAGCCCTAGCCAAGCTCTTGGTGGTGTTTTACCCCATGGCAGGGCGGGTCCGGCGAGCGGA  
 GGGGAACATCGGGTACGAAATCCACTGTAACAATAAGGGAGTGGTGTGGGTGACGCCGAAGTGGATG  
 GTACCATCGACGACTTCGAGAACTTCCAGCCAAATTACGTCTTCAACAAGTTATTAGTGCCACGGTG  
 GACTACTCCGTGAGCATCGAATTCCAGCCCGTGAGATCATTCAAATCACCAAGTTTCAATGCGGCGG  
 CTTTCGCGCTGGGAATGGCCAACCATCACACCGTCGCCGACGGCATCTCTGCTCACAACCTCATGGCGT  
 CGTGACAGAACTGGTCCGCGGGGAGCAGATCTCGCAACTGCCTAACTACGACCACCACCTGCTCTCT  
 TCAATGGGACGTGCCAAGCCCGACACTTGTCCCAGAGAGCTCCGGCTCCGACCCAAGGTAATGGAGCC  
 GCCGCCAACGCGCAAAATGGTGGAGAGGTTGTTACCTTCACTCCCGAGATGCTGAAGAAGATCAAGG  
 CCGAGGCTCTAGGTGACGGAAGTTTGGGCTCATTACCACTTTTCGAAAGCCTGTCTGCGCACCTCTTT  
 AGAGCGGTAATCCGAGCCAAGGGCTGCGCTGATTTCGGAGGAAGCCAGATTTTTTACC**N**CTATGGACGC  
 CAGAAAGCGAATCAAGCCCAATTTGCCGGAGGGCTACTTCGGCAACGCGATCATCTTCACATGCATGC  
 CTGCGAAGGTCTGCGACATCCTGGAGAN**G**GCCTCTGTCTGTTCTCAGCGCAACTGGTTCGAGAAAGTGTCT  
 GTGAAGATGACGGACGAGTATGTAAAATCTTCCTGGGCGTGGTTCGAGGCGCAGGAGCATCTCACCAT  
 GAGCTCCATCAACCTCATGGGTAAACGACATCTCCTCCGCGGGTGGTTCGGATGCCATTCTATGATA  
 CCGACTTCGGGTTTCGGGAAGCCAGTGTTTGCAGGACCTGCTGACAATCCCTATAATGGCTGCATTCTG  
 ATGCTGCCCAGTCACATTGGACCTAAAGCTATCAATGTATTTCATGGCGTTGTGGAGAGAAGACATGGA  
 GAGGTTGATGGCAGACAGCGATTTTCTCGTGACCAGCCAAGTGAATCGATCCAATATTTCTGTGCAG  
 AGTAG

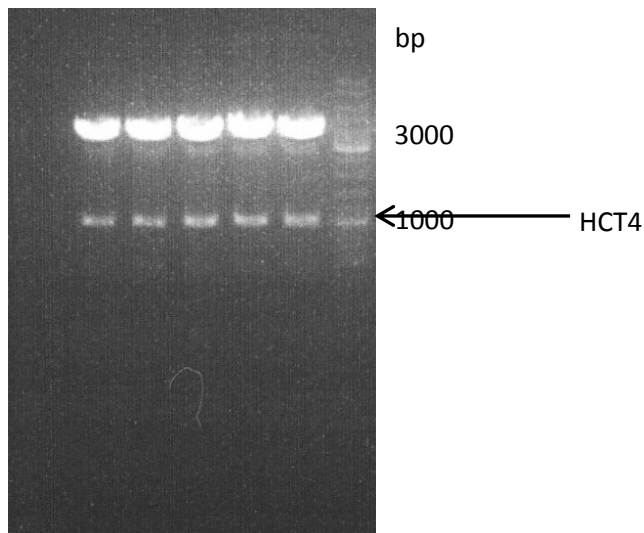


Abbildung 94 Doppelverdau von pDrive[PpHCT4] mit PvuII und HindIII, *E. coli* Klone 1-5.

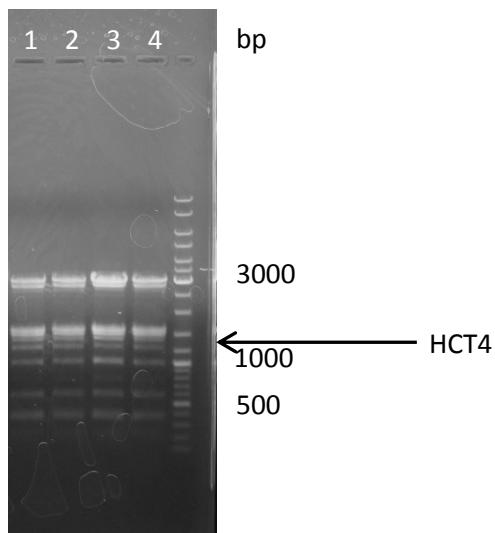


Abbildung 95 Doppelverdau von pRSET-C[PpHCT4] mit PvuII und HindIII, *E. coli* Klone 1-4.

Die Proteinsequenz besitzt mit einer Länge von 454 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 51,1 kDa. Die konservierten Bereiche sind vorhanden und entsprechen den beschriebenen Variationen (St. Pierre und de Luca 2000).

Aminosäuresequenz von PpHCT4:

```
MGIDEVTESVPRMRIISSKTSIVYLEFPAELHVLSCSICDNFVRPTHVRTLYLYRETSPGANEHVTTTR
LKAALAKLLVVFYPMAGRVRRAEGNIGYEIHCNNKGVVWVDAEVDGTIDDFENFQPNYVFNKLLVPTV
DYSVSIEFQPVQIIQITKFQCGGFALGMANHHTVADGISAHNFMASWTELVRGEQISQLPNYDHHLLS
SMGRAKPDTCPRELRLRPKVMPPPTMKMVERLFTFTPEMLKKIKAEALGDGSLGSFTTFESLSAHLF
RAVIRAKGCADSEEARFFTAMDARKRIKPNLPEGYFGNAIIFTCMPAKVCDILERPLSFSAQLVRESV
VKMTDEYVKSSWAWCEAQEHLTMSSINLMGNDISSAGWFRMPFYDTDFGFGKPVFAGPADNPYNGCIL
MLPSHIGPKAINVFMALWREDMERLMADSDFLVT SQVNRSNISCAE-
```

### e) HCT 5

HCT 5 konnte nicht aus gDNA isoliert werden. Deshalb können keine Aussagen über Introns getroffen werden. Die cDNA Sequenz weist 1509 bp auf (Abb. 96-97).

# cDNA-Sequenz von PpHCT5:

```

ATGGGTTCGAACACGGATGAGAGCTCTAGTGTGATCGATAGTGGGGTCGTTCTCGAAGATAGACTGCA
AGGGAAATCGCTAGAGCACGTGCAAACGAGCTTCGTCGCGCCCTCCTCAGCAACGCCTAGTGAGAACG
AGTGGCTTTTGTCTGGGAAGCTGGACTACTTGTGGGTTCAGTATTACACCCCTATTATTTGCTCGTTC
CCAGCCTCGCAGTTTCGGGTTTGGATCCGCAGCTGCTGTGGTGGAACGCCTGAGGGGCTCTTTAGCTGA
TGCGCTGGTTTTGTCTACCCTCTGGCTGGGAGGGTGGTGACGAGCGATGGCCCTCCGAGGATCCATT
GCAACGATGCGGGTGCTGTTTTACGGAAGCGAGCGTGGATGTGGAGCTTGTCGACCTCAAGATGGAC
GATTTCCAGCCTCAACCCTTGCTTTCGGAATGGCAGCTGCGGGGTTTAAGTATTACCCTGCTCTTCC
GACGGTTGAGGGTGGTCTTCCAGCTCTTGTTGTACAGGTGACACATTTCAAGTGTGGGGGTATTACTT
TGGCAGTTAATTGGGCACATGGAGTTGCTGATGGCCGATCTGGTCTCCACTTCATGAAGTCTTGGTCC
GAAATTGGACGGGGCATGGAGGTGTCTCTACTCCCTTATCATCGGCGTGATTTAATTCAGCCAAGAAA
TCCTCCCGTTTTCGACCAACCCCTTTAAGCCCGTGACGGTATCACCTGGTGCGGAAATTGCTTTGTCCA
ATACGACGACAGAGAACGGCAACTCGGACTCAAAAGAGTCTGTTGCAAATTCGGGAATTGGGTCAGAA
GCTAGAGGATCCGGAAGGACCTCAACGGCGGAAGAAACGAAGAAGAAATCCCATATCACACCGAAGGC
AATCGAGTTAACGAAGAATGACATAGCAAGCTTGAAGACGCATGCTTTGGAGCAGAATCCAAGTATGC
ATCTGTCAAGAGCAGACTGCGTCTCGACCCATTTGTGGCGCACCATAATCAAAGCTCGTAATCTTCCT
GGCAACGCAGTGACTCGGCTATGGGTTCACGTCGAGGGCAGGAAGATGCTGAACTTGCCACCCGGCTA
CTTCGGCAACGTGATTGGTATGATGACAGTGATAACCACTGCCAAGGAGCTTCGGGACAACCCATTTG
CATCCACCGCGAAGATAATCCATTCGTCGGTTGGTGCCATCACAGGCGAATGGTTTCAGGATCTTGTC
GACTTCGTCCAATTGATGACACCTGGTGCGTCACTCACGGGCAAGTACGCCCCGAAACCCGCCGGCGA
AGTGGCGGTTTCATACCTCATCCATTTTCTTTCTACGAGCTAGACTTTGGATTTGGTACTCCTGCAC
ATGCAATGCGCAACACCATGGGTGCGTGGGACGGACTGAATTTCAATTCTGCCGAGCTCCTGTGGTCCA
GAGAATATGCTGCTCTTGGCAAACCTTGGACCAAGACGTCTTGAACAGATTTCGTCGCCATGGTTCACGA
CATCCCCGAGTAA

```

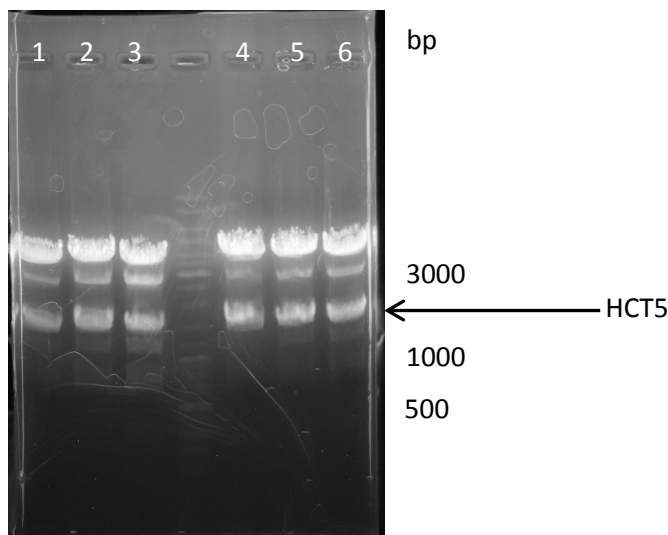


Abbildung 96 Doppelverdau von pDrive[PpHCT5] mit XhoI und EcoRI, *E. coli* Klone 1-6.

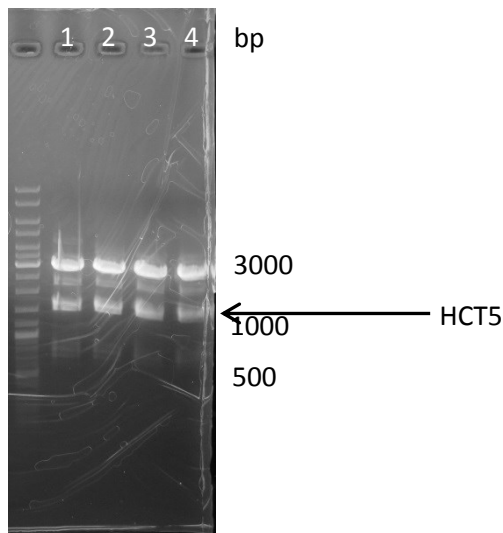


Abbildung 97 Doppelverdau von pRSET-C[PpHCT5] mit XhoI und EcoRI, *E. coli* Klone 1-4.

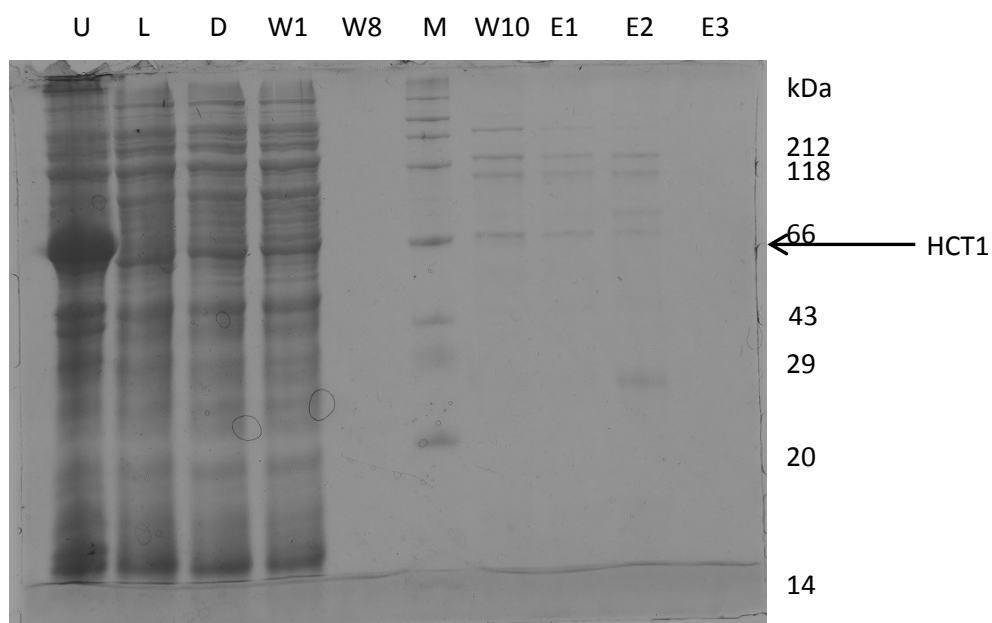
Die Proteinsequenz ist mit 502 Aminosäuren die längste der hier behandelte HCTs aus *Physcomitrella patens*. Das Molekulargewicht beträgt 54,3 kDa. Die konservierten Bereiche sind hier ohne nennenswerte Veränderungen vorhanden.

#### Aminosäuresequenz von HCT 5:

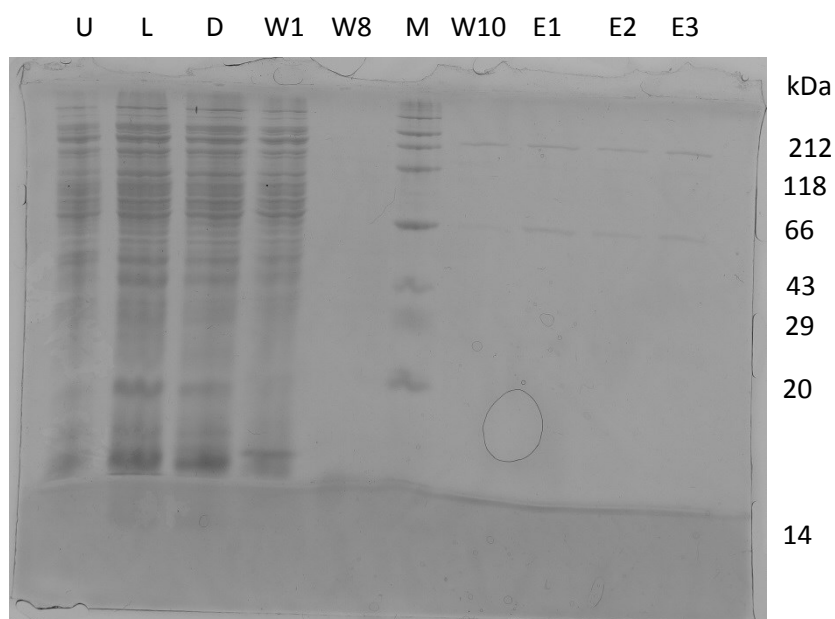
MGSNTDESSSVIDSGVVLEDRLQGKSLEHVQTSFVAPSSATPSENEWLLLGLDYLWVQYYTPIICSF  
 PASQFGFGSAAVVERLRGSLADALVLFYPLAGRVVTS DGPPRIHCNDAGAVFTEASVDVELVDLKMD  
 DFQPQPLLSGMAAAGFKYYPALPTVEGGLPALVVQVTHFKCGGITLAVNWAHGVADGRSGLHFMKSWS  
 EIGRGMEVSLLPYHRRDLIQPRNPPVSTNPFKPVTVSPGAEIALSNNTTENGNSDSKESVANSIGIGSE  
 ARGSGRTSTAEETKKKSHITPKAIELTKNDIASLKTTHALEQNPSMHLRADCVSTHLWRTIIKARNLP  
 GNAVTRLVWHVEGRKMLNLPPGYFGNVIGMMTVITTAKELRDNPFASKI IHSSVGAITGEWFQDLV  
 DFVQLMTPGASLTGKYAPKPAGEVAVSYLHFFPYELDFGFGTPAHAMRNTMGAWDGLNFILPSSCGP  
 ENMLLLANLDQDVLNRFVAMVHDIPE-

## 2. Expression von Hydroxycinnamoyltransferasen

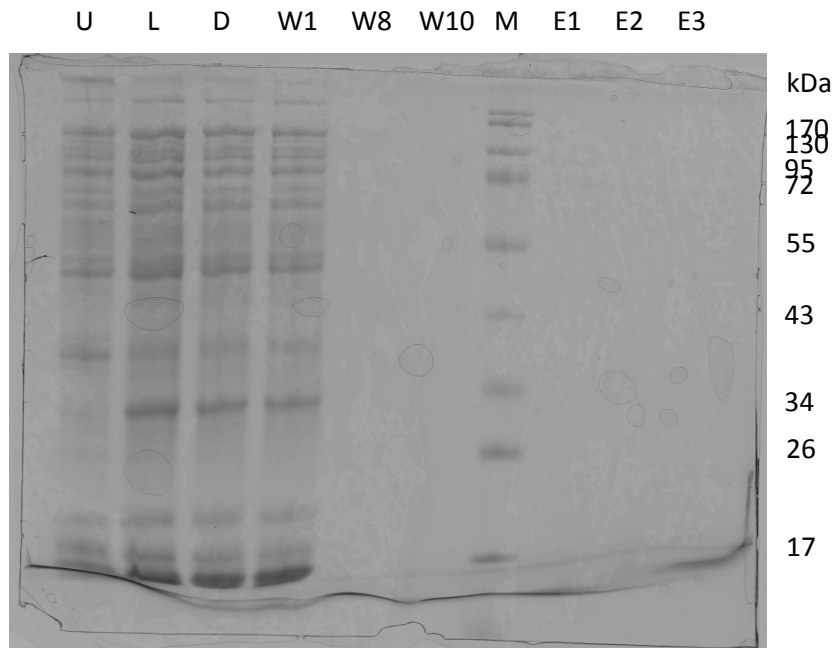
Die Expression der HCTs war auch hier mit Schwierigkeiten verbunden, da HCTs bei Expression in *E. coli* häufig als Einschlusskörperchen (inclusion bodies) vorliegen. Dies betraf HCT 1, welches bei einer Konzentration von 1 mM IPTG und einer Temperatur von  $24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  über 16 h induziert wurde sowie HCT 5, welches bei  $37\text{ °C}$  und einer IPTG Konzentration von 1 mM für 5 Stunden induziert wurde. Die anderen zwei HCTs wurden weder im LB Medium bei  $24\text{ °C}$  über Nacht noch im TB Medium bei  $37\text{ °C}$  und 5 Stunden exprimiert (Abb. 98-101). Ein weiterer Versuch, eine Expression von HCT 1 zu erreichen, kann mit der Wahl einer geringeren IPTG-Konzentration in LB oder TB-Medium bei  $24\text{ °C}$  über Nacht unternommen werden. HCT 5 sollte mit 1 mM IPTG in TB-Medium 16 h bei  $24\text{ °C}$  induziert werden. Andernfalls kann eine Aufreinigung und Umfaltung der Einschlusskörperchen *in vitro* vorgenommen werden. Dafür kann man die Proteine durch fraktionierte Resuspension mit einem denaturierenden Agens in hoher Konzentration (etwa Harnstoff oder Guanidiniumchlorid) lösen und anschließend durch Dialyse renaturieren. Für die zwei anderen HCTs können andere *E. coli* Stämme verwendet werden, die bei noch kühleren Temperaturen induziert werden. Falls dies ebenfalls erfolglos ist, sollte die Anwendung eines eukaryotischen Expressionssystems in Erwägung gezogen werden, da diese zwei Proteine offenbar komplexere Faltungen erfordern, zu denen *E. coli* nicht in der Lage ist. Geeignet könnten dafür Hefezellen sein, etwa *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*.



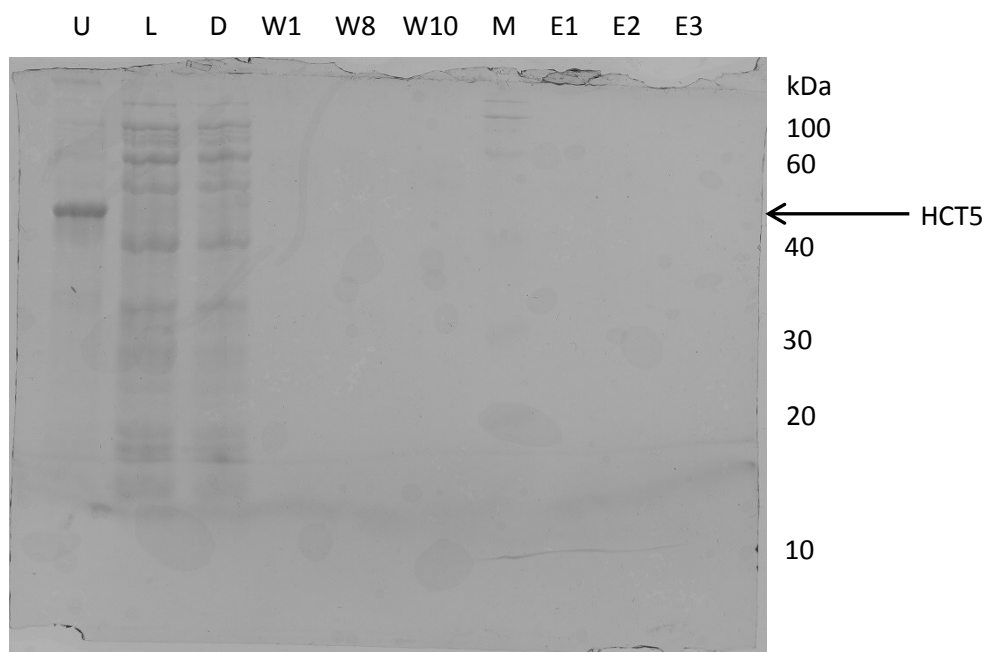
**Abbildung 98 Heterolog exprimierte PpHCT1. Erwartet 48 kDa, LB-Medium, 1 mM IPTG, 25 °C, 16 h, U = unlösliche Fraktion, L = lösliche Fraktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktionen, M = Größenmarker, E = Elutionsfraktionen.**



**Abbildung 99 Heterolog exprimierte PpHCT2. Erwartet 42 kDa, LB-Medium, 1 mM IPTG, 25 °C, 16 h, U = unlösliche Fraktion, L = lösliche Fraktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktionen, M = Größenmarker, E = Elutionsfraktionen.**



**Abbildung 100** Heterolog exprimierte PpHCT4. Erwartet 51 kDa, TB-Medium, 1 mM IPTG, 37 °C, 5 h, U = unlösliche Fraktion, L = lösliche Fraktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktionen, M = Größenmarker, E = Elutionsfraktionen.



**Abbildung 101** Heterolog exprimierte PpHCT1. Erwartet 54 kDa, TB-Medium, 1 mM IPTG, 37 °C, 5 h, U = unlösliche Fraktion, L = lösliche Fraktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktionen, M = Größenmarker, E = Elutionsfraktionen.

### 3. Charakterisierung heterolog exprimierter Hydroxycinnamoyltransferasen

Trotz der Tatsache, dass alle PpHCTs nicht in einer löslichen Proteinfraction erhalten werden konnten, wurden Aktivitätstests sowohl mit dem bakteriellen Rohextrakt als auch nach Histag- und PD-10-Aufreinigung durchgeführt, da das Vorhandensein von Einschlusskörperchen häufig mit einer geringen Menge an korrekt gefaltetem Protein einhergeht. Dabei wurden die folgenden Akzeptoren mit dem Caffeoyl-CoA Donor kombiniert:



DL-4-Hydroxyphenylmilchsäure (pHPL)	Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure)
DL-3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure (DHPL)	3-Hydroxybenzoesäure
D-Phenylalanin	4-Hydroxybenzoesäure
L-Phenylalanin	2,3-Dihydroxybenzoesäure
Shikimisäure	2,4-Dihydroxybenzoesäure
Chinasäure	DL-Äpfelsäure
4-Hydroxybenzylalkohol	D-Weinsäure
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	L-Weinsäure
3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol	DL- und meso-Weinsäure
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-propanol	D-Milchsäure
<i>t</i> -Zimtalkohol	L-Milchsäure
Coniferylalkohol	DL-Milchsäure
3,4-Dimethoxy-Zimtalkohol	L-Glutaminsäure
Anthranilsäure (2-Aminobenzoessäure)	

### Standardtest auf HCT-Aktivität mit heterolog exprimierten PpHCTs

Gesamtvolumen 125 µl  
 67,5 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0  
 12,5 µl 0,1 M DTT  
 10 µl 12,5 mM Ascorbinsäure  
 5 µl 20 mM Akzeptor (siehe oben, in 20% Ethanol)  
 2 µl 2,5 mM Caffeoyl-CoA  
 20 µl heterologes Enzym (Start)  
 30 Min (Inkubation, 30 °C) + 0 Min (Kontrolle/Eis)

Die HPLC Chromatogramme weisen darauf hin, dass kein neues spezifisches Produkt gebildet wurde. Damit fielen sämtliche HCT-Tests inklusive RAS, HQT und HST negativ aus. Obwohl Einschlusskörperchen gebildet wurden, war die Menge des aktiven löslichen Proteins zu gering, um in nachweisbaren Mengen Produkte zu bilden, oder das Substrat der Enzyme war nicht unter den verwendeten Substraten vertreten. Auch hier besteht die Möglichkeit, die Einschlusskörperchen durch Extraktion und Renaturierung umzufalten oder andere Expressionssysteme anzuwenden. Eine intensive phytochemische Analyse von *Physcomitrella patens* würde hilfreich sein, die möglichen Produkte des Enzymtests und damit die natürlichen Substrate zu finden. Da es neben den 12 vorgestellten und fünf ausgewählten HCTs noch eine Reihe weiterer BAHD-Acyltransferasen im *Physcomitrella* Genom gibt, könnten auch diese interessante Kandidaten zur Erforschung des Kaffeesäuremetabolismus sein.

## VI. Zusammenfassung

### Biosynthese von Kaffeesäurederivaten im Ackerhornmoos *Anthoceros agrestis* und im Kleinen Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*

Soheil Pezeshki

---

Rosmarinsäure gehört neben anderen Kaffeesäurederivaten zu den sogenannten Labiatengerbstoffen. Sie stammen aus dem Stoffwechsel aromatischer Aminosäuren und dienen der Pflanze als antivirales, antibiotisches und fungizides Agens und als molluskizider Fraßschutz. In Tierversuchen zeigen diese Depside eine Reihe gesundheitsförderlicher Eigenschaften. Die Rosmarinsäurebiosynthese ist in Pflanzen der Familie Lamiaceae aufgeklärt. Sie erfolgt dort mit den Ausgangsstoffen L-Phenylalanin und L-Tyrosin, welche mit fünf löslichen und drei ER-membrangebundenen Enzymen im Cytosol zur Rosmarinsäure reagieren. Sie ist der Ester der Kaffeesäure und der 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure

Entscheidend an dieser Biosynthese ist die Rosmarinsäure Synthase (RAS), ein Enzym des Sekundärmetabolismus, welches zu den Hydroxycinnamoyltransferasen (HCT) der Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen gehört. Es katalysiert die Veresterung von einem Molekül Coenzym A-aktivierter 4-Cumarsäure mit einem Molekül 4-Hydroxyphenyllactat. Die RAS katalysiert damit sehr ähnliche Reaktionen wie sie bei der Biosynthese von Chlorogensäure und Caffeoyl-Shikimat vorkommen. Auch diese Enzyme sind HCTs. Daneben finden sich noch viele weitere Kaffeesäurederivate, die mit HCTs oder mit Vertretern anderer Enzymfamilien synthetisiert werden.

Das Ackerhornmoos *Anthoceros agrestis* ist ein Vertreter der Familie Anthocerotaceae der Abteilung Anthocerotophyta. *A. agrestis* kann Rosmarinsäure und andere Kaffeesäureester in Zellsuspensionskulturen akkumulieren. Damit gehören die Hornmoose zu den ursprünglichsten Pflanzen, die Rosmarinsäure herstellen können. Die Rosmarinsäurebiosynthese ist im Ackerhornmoos noch unerforscht.

Mittels Kulturcharakterisierungen von *A. agrestis* war es möglich, verschiedene vitale Parameter der Zellsuspensionskultur in zwei verschiedenen Medien zu verfolgen. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen gut 10% des Trockengewichts an Rosmarinsäure in CB-M Medium akkumulieren können sowie bis zu 5% in CB-2 Medium. In CB-M Medium wird das Rosmarinsäureglucosid bis zu 1% akkumuliert und in CB-2 bis zu 3%. Die Mediums- (Leitfähigkeit, pH und Zuckergehalt) und Wachstumsparameter (Frisch-, Trockengewicht, Proteingehalt) fielen in beiden Medien ähnlich aus, auch wenn es quantitative Unterschiede gab. Diese Daten deuten darauf hin, dass der Stoffwechsel der Zellen zwischen Tag 3 und 6 am aktivsten ist.

Ferner wurden für zwei Enzyme des Rosmarinsäurestoffwechsels, der Tyrosin Aminotransferase (TAT) und der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) Aktivitätstests mit Proteinproben aus dem Kulturverlauf durchgeführt. Auch hier zeigte sich ein Maximum der spezifischen Aktivität zwischen dem 3. und 6. Tag. Für eine der drei Genkopien der PAL wurde mit Hilfe genspezifischer Primer eine Expressionsanalyse erstellt. Diese Daten decken sich mit dem Verlauf des Enzymaktivitätstests und der Rosmarinsäureakkumulation. Die Genexpression für drei HCTs aus *A. agrestis* ergab ein unterschiedliches Verhalten in der Transkriptmenge im Verlauf der Charakterisierung, wobei sich die Expression der zweiten HCT mit Daten einer semiquantitativen PCR für die RAS aus der Rosmarinsäure-akkumulierenden Lamiacee *Melissa officinalis* deckt.

Die kinetische Analyse der PAL und der TAT aus dem Proteinrohextrakt ergab einen apparenten  $K_M$ -Wert der PAL für L-Phenylalanin von 45,3 (nach Hanes-Wolf) bzw. 35,0  $\mu\text{M}$  (nach Lineweaver-Burk) und einen apparenten  $K_M$ -Wert der TAT für L-Tyrosin von 7,1 (HW) bzw. 4,7 mM (LB) und für  $\alpha$ -Ketoglutarat von 9,6 (HW) bzw. 4,5 mM (LB).

Enzymtests zur Ermittlung der RAS-Aktivität blieben erfolglos. Dabei wurden verschiedene Testbedingungen geändert, z.B. das Puffersystem und dessen pH, Enzym- und Substratmenge, die Substrate der Reaktion, die Enzympräparation, die Inkubationstemperatur und die Cofaktoren sowie die Detektion über HPLC und UV/VIS-Spektroskopie.

Durch Gensequenzalignments von codierenden Sequenzen verschiedener pflanzlicher Organismen, zum großen Teil von Sporenpflanzen, wurden degenerierte Primer für die PCR von PAL, TAT und von HCTs erstellt. Es wurden Mittelfragmente einer PAL und einer HCT gefunden. Diese konnten mit klassischer 3'-RACE und mit 5'-SMARTer RACE PCR vervollständigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass von beiden Enzymen mehrere Gene in *A. agrestis* vorkommen. Insgesamt wurden vier Sequenzen von HCTs und zwei Sequenzen für PAL im Hornmoos gefunden, davon waren zwei Sequenzen der HCTs vollständig. Eine weitere Sequenz einer HCT wurde nach Daten des *Anthoceros agrestis* Genomsequenzierungsprojekts (persönliche Mitteilung) als Vollängensequenz amplifiziert. Drei HCTs (1, 2 und 5) wurden erfolgreich in Expressionsvektoren für die Expression in *E. coli* eingebaut und *E. coli* damit transformiert. HCT 2 konnte in hoher Ausbeute in *E. coli* exprimiert und extrahiert werden, während HCT 1 nur als Einschlusskörperchen vorlag. Der Enzymaktivitätstest ergab für keine der untersuchten Bakterienproteinextrakte und Enzymbereinigungen nach Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie eine Enzymaktivität mit verschiedenen Substratkombinationen.

Phylogenetische Untersuchungen ergaben eine klare Zuordnung der PAL und der HCTs aus *A. agrestis* zu den homologen Enzymen aus anderen Sporenpflanzen.

Das Kleine Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens* ist ein sequenziertes Laubmoos, das vielfältige Anwendungen in der Biotechnologie hat. Es gehört der Familie Funariaceae der Abteilung der Bryophyta an. Obwohl in vielen Moosen verschiedene Kaffeesäurederivate bekannt sind, ist zu deren Biosynthese und Vorkommen in *Physcomitrella* wenig bekannt. Es sind zwölf codierende Sequenzen für HCTs im Genom von *Physcomitrella* verzeichnet, jedoch ist von diesen HCTs die Aktivität unbekannt. Von diesen zwölf Sequenzen wurden nach Proteinsequenzalignments fünf für eine Expression in *E. coli* ausgewählt. Diese wiesen hohe Sequenzähnlichkeit mit HCTs aus anderen Pflanzen auf, die für die Bildung niedermolekularer Kaffeesäureverbindungen verantwortlich sein könnten (Zwischen 31 und 53% Sequenzähnlichkeit). Von den fünf ausgewählten konnten alle bis auf die dritte intronfrei amplifiziert und damit für Expressionsversuche verwendet werden. Die Expression von HCT 1 und 5 gelang nur in Form von Einschlusskörperchen, während die HCTs 2 und 4 nicht exprimiert werden konnten. Erneut wurden mit dem bakteriellen Rohextrakt und mit dem Reinprotein nach Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie Enzymaktivitätstest mit verschiedenen Kombinationen von Substraten durchgeführt. Diese Tests blieben ebenfalls erfolglos.

Es bietet sich an, die Einschlusskörperchen der HCTs aus *A. agrestis* und *P. patens* aufzureinigen und *in vitro* in native Form zu falten. Anschließend sollten die Aktivitätstests mit diesen Enzymen sowie der korrekt gefalteten AaHCT2 wiederholt werden und Reaktionsprodukte mittels kombinierter LC/MS auf Massen, die schwerer als Kaffeesäure sind, untersucht werden. HCTs, die gar nicht exprimiert wurden, sollten für eine Expression in einem anderen *E. coli*-Stamm oder in einer Hefe verwendet werden. Die korrekten Vollängensequenzen der PAL können mittels RACE-PCR Methoden ermittelt werden. Die anschließende Expression in *E. coli* und Charakterisierung der Enzymaktivität sollten problemlos verlaufen. Eine Amplifizierung und Charakterisierung der TAT und der anderen Enzyme der Rosmarinsäurebiosynthese aus *Anthoceros agrestis* sollten mit Daten der Genomsequenzierung möglich sein.

## VII. Summary

### Biosynthesis of caffeic acid derivatives in the hornwort *Anthoceros agrestis* and in the moss *Physcomitrella patens*

Soheil Pezeshki

---

Rosmarinic acid, amongst other caffeic acid derivatives, belongs to the so called „Labiatergestoffe“. They are derived from the metabolism of aromatic amino acids and are important plant responses to herbivores as well as to viral, bacterial or fungal infections. In animal and cell culture experiments these depsides showed interesting effects and it is reported, that they are beneficial for human health.

The biosynthetic pathway of rosmarinic acid is elucidated in Lamiaceae. Its precursors are L-phenylalanine and L-tyrosine, which are transformed to rosmarinic acid, an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid, with five soluble cytosolic and three ER-membrane bound enzymes.

The key enzyme of this pathway is rosmarinic acid synthase (RAS). It is a hydroxycinnamoyltransferase (HCT), which belongs to the superfamily of BAHD acyltransferases. It catalyses the ester-forming reaction between the coenzyme A-activated 4-coumaric acid and 4-hydroxyphenyllactic acid. This reaction is similar to other known HCT reactions responsible for the formation of chlorogenic acid or caffeoylshikimic acid. There are many other caffeic acid derivatives formed by HCTs or representatives from other enzyme families.

The hornwort *Anthoceros agrestis*, family Anthocerotaceae and division Anthocerophyta, can produce and accumulate rosmarinic acid and other caffeic acid derivatives in cell suspension cultures. Therefore *A. agrestis* is the earliest known land plant, which can produce rosmarinic acid. However, the biosynthetic pathway of rosmarinic acid production in hornworts is not known.

By a culture characterisation of *A. agrestis* in different liquid media, it was possible to track different vital parameters of the cell suspensions over a course of two weeks. *A. agrestis* can accumulate up to 10% of its dry weight in rosmarinic acid in CB-M medium and up to 5% in CB-2. The rosmarinic acid glucoside can be accumulated up to 1% in CB-M medium and up to 3% in CB-2 medium. Though the quantities may be different, the general tendencies of the medium (pH, conductivity, sugar content) and growth (fresh weight, dry weight, protein content) parameter are comparable. The data indicate that the cells reach maximum metabolic activity between day 3 and 6 after inoculation in fresh medium. Furthermore, two enzymes of the rosmarinic acid biosynthetic pathway, as known in Lamiaceae, were tested for their activity over the course of two weeks: tyrosine aminotransferase (TAT) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Here, too, the maximum of specific enzyme activity was reached after day 3 and declined after day 6. For one of the three putative gene copies of PAL, qRT-PCR with gene-specific primers showed similar expression levels as the enzyme activity and both correlate with the amount of rosmarinic acid. Three HCTs were likewise analysed with qRT-PCR and they showed three different expression patterns. Here HCT 2 of *A. agrestis* showed similar tendencies as the RAS from *Melissa officinalis*, a rosmarinic acid accumulating Lamiaceae, which was analysed via semiquantitative PCR in a comparable culture characterisation.

Kinetic assays of PAL and TAT from crude protein extracts showed apparent  $K_M$ -values of 45.3 (Hanes Woolf) and 35.0  $\mu\text{M}$  (Lineweaver-Burk) for L-phenylalanine for PAL. Apparent  $K_M$ -values of TAT for tyrosine are 7.1 (HW) and 4.7 mM (LB) and for 2-oxoglutarate 9.6 (HW) and 4.5 mM (LB).

Enzyme assays to detect RAS activity remained unsuccessful. The assay conditions were changed, regarding enzyme preparation methods and enzyme amounts, substrate and substrate

concentration, buffer system and pH, incubation temperature, addition of cofactors or detection system via HPLC or UV/VIS spectroscopy.

Using alignments of coding gene sequences of various plants, mainly spore plants, degenerate primers for PAL, TAT and HCT were designed. These primers were used for PCR, which generated fragments of a PAL and a HCT. These fragments were completed with classical 3'-RACE and 5'-SMARTer RACE techniques. During the work, various copies of both genes were found in *A. agrestis*. Four sequences for HCTs and two sequences for PALs were found independently, two of these HCT sequences were found as complete coding sequence. Another coding sequence of an HCT was amplified using data from the *Anthoceros agrestis* genome sequencing project after a personal notification. HCTs 1, 2 and 5 were successfully ligated in an expression vector and used for the transformation of *E. coli*. While HCT 2 was expressed in *E. coli* in high yield, HCT 1 was only expressed as inclusion bodies, HCT 5 was not expressed. Enzyme activity tests with both, crude bacterial extract and purified enzyme after affinity and size exclusion chromatography, were negative with various combinations of acceptor and donor substrates.

Phylogenetic analysis revealed distinct assignments of PAL and HCT from *A. agrestis* to homologous enzymes from other spore plants.

The moss *Physcomitrella patens*, family Funariaceae and division Bryophyta, is a sequenced organism and is broadly used in biotechnology. Though many caffeic acid derivatives are present in bryophytes, their occurrence and biosynthesis in *Physcomitrella* is not known. Twelve HCTs are known in *Physcomitrella*, all of which with unknown activity. Using protein alignments, five of these HCTs were chosen, as they showed high sequence similarities (31-53%) to other HCTs with putative or proven enzyme activity for the formation of caffeic acid derivatives. Four out of five could be amplified with PCR without introns and could therefore be used for expression in *E. coli*. HCTs 1 and 5 were expressed as inclusion bodies, while HCTs 2 and 4 were not expressed at all. Enzyme assays with crude bacterial extracts and purified enzyme were again negative for all tested combinations of substrates.

It is possible to purify and refold the HCTs from *A. agrestis* and *P. patens* *in vitro* and use the native enzyme along with HCT 2 again for activity tests. Reaction products can be analysed with LC/MS. Products with molecular weights higher than caffeic acid should be isolated and identified. HCTs, which were not expressed with the tested conditions, could be used for expression in other *E. coli* strains or in yeasts. The correct full-length sequence of PAL can be determined with RACE methods. Amplification and characterisation of TAT as well as the other enzymes of rosmarinic acid biosynthesis in *Anthoceros agrestis* should be manageable in future.

## VIII. Referenzen

- Abdullah Y (2010) Dissertation - Analyse von phenolischen Naturstoffen, Philipps-Universität Marburg
- Akash MS, Rehman K, Chen S (2014) Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition* 30:755–763
- Akoh CC, Lee G, Liaw Y, Huang T, Shaw J (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* 43:534–552
- Appert C, Logemann E, Hahlbrock K, Schmid J, Amrhein N (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* 225:491–499
- Arróniz-Crespo M, Núñez-Olivera E, Martínez-Abaigar J (2008) Hydroxycinnamic acid derivatives in an aquatic liverwort as possible bioindicators of enhanced UV radiation. *Environ. pollut.* 151:8–16
- Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F (2013) Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry* 91:52–80
- Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT (2009) Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother. Res.* 23:1075–1081
- Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J (2004) Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci.* 75:165–178
- Bainard JD, Villarreal JC, Gregory R (2013) Genome size increases in recently diverged hornwort clades. *Genome* 56:431–435
- Bar-Even A, Noor E, Savir Y, Liebermeister W, Davidi D, Tawfik DS, Milo R (2011) The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry* 50:4402–4410
- Bartsch S, Bornscheuer UT (2009) A single residue influences the reaction mechanism of ammonia lyases and mutases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48:3362–3365
- Becker B, Marin B (2009) Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann. Bot.* 103:999–1004
- Benkert P, Biasini M, Schwede T (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27:343–350
- Berger A, Meinhard J, Petersen M (2006) Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta* 224:1503–1510
- Binding H, Mordhorst G (1991) Gametophyte Regeneration and Apospory from *Archegoniate Protoplasts* Under Conditions Devised for Higher Plants. *Bot. Acta* 104:330–335
- Bird CR, Smith TA (1983) Agmatine Coumaroyltransferase From Barley Seedlings. *Phytochemistry* 22:2401–2403

- Blaikley NM (1932) The structure of the foot in certain mosses and in *Anthoceros Laevis*. In: Transactions of the Royal Society of Edinburgh, Edinburgh, Eds. Robert Grant & Son
- Bopp M, Brandes H (1964) Versuche zur Analyse der Protonemaentwicklung der Laubmoose. *Planta* 62:116–136
- Bower NI, Johnston IA (2010) Targeted rapid amplification of cDNA ends (T-RACE) - an improved RACE reaction through degradation of non-target sequences. *Nucleic Acids Research* 38:e194
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Bryksin AV, Matsumura I (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* 48:463–465
- Calabrese JC, Jordan DB, Boodhoo A, Sariaslani S, Vannelli T (2004) Crystal Structure of Phenylalanine Ammonia Lyase: Multiple Helix Dipoles Implicated in Catalysis. *Biochemistry* 43:11403–11416
- Chasov AV, Beckett RP, Minibayeva FV (2012) Peroxidases of *Anthoceros natalensis*, an evolutionary precursor of vascular plants. *Dokl Biol Sci* 447:357–359
- Chenchik A, Zhu YY, Diatchenko L, Li R, Hill J, Siebert PD (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In: *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*, Eds. Siebert, P. & Larrick, J. (Bio-Techniques Books, MA), pp. 305–319
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156–159
- Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MA (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69:2149–2156
- Clepet C (2004) Improved full-length cDNA production based on RNA tagging by T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Research* 32:6e
- Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG (2004) The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65:1557–1564
- Comino C, Hehn A, Moglia A, Menin B, Bourgaud F, Lanteri S, Portis E (2009) The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. *BMC Plant Biol.* 9:30
- Comino C, Lanteri S, Portis E, Acquadro A, Romani A, Hehn A, Larbat R, Bourgaud F (2007) Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L. *BMC Plant Biol.* 7:14
- Couture J, Trievel RC (2006) Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:753–760
- D'Auria JC (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:331–340

- Decker EL, Reski R (2004) The moss bioreactor. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:166–170
- De-Eknamkul W, Ellis BE (1987) Tyrosine Aminotransferase: The Entry point Enzyme Of The Tyrosine-Derived Pathway In Rosmarinic Acid Biosynthesis. *Phytochemistry* 26:1941–1946
- Dekker FJ, Haisma HJ (2009) Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discovery Today* 14:942–948
- Desirò A, Duckett JG, Pressel S, Villarreal JC, Bidartondo MI (2013) Fungal symbioses in hornworts: a chequered history. *Proc. Biol. Sci.* 280:20130207
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097
- Döring AS (2013) Dissertation - Welche Hydroxycinnamoyltransferasen sind in *Coleus blumei* und in *Glechoma hederacea* nachweisbar und worin besteht der Einfluss von Ozon auf *Melissa officinalis*? Philipps-Universität Marburg
- Döring AS, Pellegrini E, Campanella A, Trivellini A, Gennai C, Petersen M, Nali C, Lorenzini G (2014) How sensitive is *Melissa officinalis* to realistic ozone concentrations? *Plant Physiol. Biochem.* 74:156–164
- Dubois M, Bailly F, Mbemba G, Mouscadet J, Debyser Z, Witvrouw M, Cotellet P (2008) Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. *J. Med. Chem.* 51:2575–2579
- Duff RJ, Villarreal JC, Cargill DC, Renzaglia KS (2007) Progress and challenges toward developing a phylogeny and classification of the hornworts. *Bryologist* 110:214–243
- Egener T, Granado J, Guitton M, Hohe A, Holtorf H, Lucht JM, Rensing SA, Schlink K, Schulte J, Schween G, Zimmermann S, Duwenig E, Raka B, Reski R (2002) High frequency of phenotypic deviations in *Physcomitrella patens* plants transformed with a gene-disruption library. *BMC Plant Biol.* 2:6 DOI: 10.1186/1471-2229-2-6
- Ellis BE, Towers GH (1970) Biogenesis of Rosmarinic Acid in *Mentha*. *Biochem. J.* 118:291–297
- Ellman GL (1959) Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70–77
- Emiliani G, Fondi M, Fani R, Gribaldo S (2009) A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biol. Direct* 4:7 DOI: 10.1186/1745-6150-4-7
- Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller GA (1993) Reduction of Background Problems in Nonradioactive Northern and Southern Blot Analyses Enables Higher Sensitivity Than <sup>32</sup>P-Based Hybridizations. *Anal. Biochem.* 210:235–244
- Escamilla-Treviño LL, Shen H, Hernandez T, Yin Y, Xu Y, Dixon RA (2014) Early lignin pathway enzymes and routes to chlorogenic acid in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Mol. Biol.* 84:565–576
- Fellenberg C, Böttcher C, Vogt T (2009) Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* flower buds. *Phytochemistry* 70:1392–1400
- Ferrer J, Austin MB, Stewart C, Noel JP (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem.* 46:356–370



- Fiedler E, Soll J, Schultz G (1982) The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta* 155:511–515
- Flurkey WH, Jen JJ (1978) Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.* 43:1826–1829
- Fritz RR, Hodgins DS, Abell CW (1976) Phenylalanine ammonia-lyase, Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *J. Biol. Chem.* 251:4646–4650
- Fuentes E, Palomo I (2014) Mechanisms of endothelial cell protection by hydroxycinnamic acids. *Vasc. Pharmacol.* 63:155–161
- Furtado MA, de Almeida, LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC (2008) Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 657:150–154
- Gerrienne P, Dilcher DL, Bergamaschi S, Milagres I, Pereira E, Rodrigues, MAC (2006) An exceptional specimen of the early land plant *Cooksonia paranensis*, and a hypothesis on the life cycle of the earliest eutracheophytes. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 142:123–130
- Gertlowski C, Petersen M (1993) Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 34:183–190
- Gou J, Yu X, Liu C (2009) A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:18855–18860
- Grant GA (1989) A new family of 2-hydroxyacid dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:1371–1374
- Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M (2009) A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis anthers* and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J.* 58:246–259
- Guo J, Ling H, Wu Q, Xu L, Que Y (2014) The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Sci. Rep.* 4:7042-7052
- Haig D, Wilczek A (2006) Sexual conflict and the alternation of haploid and diploid generations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361:335–343
- Hanes CS (1932) Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* 26:1406–1421
- Hao Z, Charles DJ, Yu L, Simon JE (1996) Purification and characterisation of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum Basilicum*. *Phytochemistry* 43:735–739
- Harborne JB (1966) Caffeic Acid Ester Distribution in Higher Plants. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* 21:604–605
- Harborne JB, Janet Corner J (1961) Plant Polyphenols: Hydroxycinnamic Acid-Sugar Derivatives. *Biochem. J.* 81:242-250

- Harris E (2008) Ethnobotany: traditional uses and folk classification of bryophytes. *Bryologist* 111:169–217
- Häusler E, Petersen M, Alfermann AW (1991) Hydroxyphenylpyruvate Reductase from Cell Suspension Cultures of *Coleus blumei* Benth. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 46:371–376
- Häusler E, Petersen M, Alfermann AW (1993) Isolation of protoplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. *Plant Cell Rep.* 12:510–512
- Hedberg C, Hesse M, Werner C (1996) Spermine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases in *Aphelandra tetragona*. *Plant Science* 113:149–156
- Hedges SB, Kumar S (eds) (2009) *The Timetree of Life*. Oxford University Press, Oxford
- Herrmann KM (1995) The Shikimate Pathway: Early Steps in Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 7:907–919
- Hippolyte I, Marin B, Baccon JC, Jonard R (1992) Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Rep.* 11:109–112
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2004) Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Cell* 16:1446–1465
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M (2003) Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. *J. Biol. Chem.* 278:95–109
- Hohe A, Egner T, Lucht JM, Holtorf H, Reinhard C, Schween G, Reski R (2004) An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss, *Physcomitrella patens*. *Curr. Genet.* 44:339–347
- Hohe A, Reski R (2005) From axenic spore germination to molecular farming. One century of bryophyte in vitro culture. *Plant Cell Rep.* 23:513–521
- Hohlfeld M, Veit M, Strack D (1996) Hydroxycinnamoyltransferases involved in the accumulation of Caffeic Acid Esters in Gametophytes and Sporophytes of *Equisetum arvense*. *Plant Physiol.* 111:1153–1159
- Hyun MW, Yun YH, Kim JY, Kim SH (2011) Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. *Mycobiol.* 39:257–265
- Jiang C, Schommer CK, Kim SY, Suh D (2006) Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* 67:2531–2540
- Joos HJ, Hahlbrock K (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *Eur. J. Biochem.* 204:621–629
- Jorrín J, López-Valbuena R, Tena M (1988) Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Biochim. Biophys. Acta* 964:73–82

- Kalghatgi KK, Subba Rao PV (1975) Microbial L-Phenylalanine Ammonia-Lyase: Purification, Subunit Structure and Kinetic Properties of the Enzyme from *Rhizoctonia Solani*. *Biochem. J.* 149:65-72
- Kang S, Kang K, Chung GC, Choi D, Ishihara A, Lee D, Back K (2006) Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin *N*-hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiol.* 140:704–715
- Karwatzki B, Petersen M, Alfermann AW (1989) Transient activity of enzymes involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med.* 55:663–664
- Kenrick P, Crane PR (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389:33–39
- Kenrick P, Wellman CH, Schneider H, Edgecombe GD (2012) A timeline for terrestrialization: consequences for the carbon cycle in the Palaeozoic. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 367:519–536
- Kikuta Y, Ueda H, Takahashi M, Mitsumori T, Yamada G, Sakamori K, Takeda K, Furutani S, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Matsuda K (2012) Identification and characterization of a GDSL lipase-like protein that catalyzes the ester-forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium*- a new target for plant protection. *Plant J.* 71:183–193
- Kim KH, Janiak V, Petersen M (2004) Purification, cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei*. *Plant Mol. Biol.* 54:311-323
- Koukol J, Conn EE (1961) The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants: Purification and Properties of the Phenylalanine Deaminase of *Hordeum Vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236:2692–2698
- Kroken SB, Graham LE, Cook ME (1996) Occurrence and Evolutionary Significance of Resistant Cell Walls in Charophytes and Bryophytes. *Am. J. Bot.* 83:1241–1254
- Kumar S, Stecher G, Peterson D, Tamura K (2012) MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics* 28:2685–2686
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lallemant LA, Zubieta C, Lee SG, Wang Y, Acajjaoui S, Timmins J, McSweeney S, Jez JM, McCarthy JG, McCarthy AA (2012) A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. *Plant Physiol.* 160:249–260
- Landmann C, Hücherig S, Fink B, Hoffmann T, Dittlein D, Coirer HA, Schwab W (2011) Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.). *Planta* 234:305–320
- Lee E, Facchini PJ (2011) Tyrosine aminotransferase contributes to benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Physiol.* 157:1067–1078
- Lee J, Scagel CF (2013) Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. *Front. Chem.* 1:40

- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C. (2000) Cloning of the SNG1 Gene of *Arabidopsis* Reveals a Role for a Serine Carboxypeptidase-like Proein as an Acyltransferase in Secondary Metabolism. *Plant Cell* 12:1295–1306
- Li F, Villarreal JC, Kelly S, Rothfels CJ, Melkonian M, Frangedakis E, Ruhsam M, Sigel EM, Der JP, Pittermann J, Burge DO, Pokorny L, Larsson A, Chen T, Weststrand S, Thomas P, Carpenter E, Zhang Y, Tian Z, Chen L, Yan Z, Zhu Y, Sun X, Wang J, Stevenson DW, Crandall-Stotler BJ, Shaw AJ, Deyholos MK, Soltis DE, Graham SW, Windham MD, Langdale JA, Wong GK, Mathews S, Pryer KM (2014) Horizontal transfer of an adaptive chimeric photoreceptor from bryophytes to ferns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:6672–6677
- Li X, Bonawitz ND, Weng J, Chapple C (2010) The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. *Plant Cell* 22:1620–1632
- Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS (2012a) Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.* 109:851–871
- Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS (2012b) The origin of the sporophyte shoot in land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.* 110:935–941
- Lineweaver H, Burk D (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56:658–666
- Liu D, Shi L, Han C, Yu J, Li D, Zhang Y (2012) Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS ONE* 7:e46451
- Liu RH (2013) Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv. Nutr.* DOI: 10.3945/an.112.003517
- Lois R, Dietrich A, Hahlbrock K, Schulz W (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.* 8:1641–1648
- Lotfy S, Javelle F, Negrel J (1995) Distribution of hydroxycinnamoyl-CoA:  $\omega$ -hydroxypalmitic acid *O*-hydroxycinnamoyltransferase in higher plants. *Phytochemistry* 40:389–391
- Lotfy S, Javelle F, Negrel J (1996) Purification and characterization of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:  $\omega$ -hydroxypalmitic acid *O*-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cell-suspension cultures. *Planta* 199:475–480
- Lotfy S, Negrel J, Javelle F (1994) Formation Of  $\omega$ -Feruloyloxypalmitic Acid by an Enzyme from Wound-Healing Potato Tuber Discs. *Phytochemistry* 35:1419–1424
- Ludwig IA, Clifford MN, Lean, MEJ, Ashihara H, Crozier A (2014) Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.* 5:1695–1717
- Luo J, Nishiyama Y, Fuell C, Taguchi G, Elliott K, Hill L, Tanaka Y, Kitayama M, Yamazaki M, Bailey P, Parr A, Michael AJ, Saito K, Martin C (2007) Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50:678–695

- Ma X, Koepke J, Panjikar S, Fritzsche G, Stöckigt J (2005) Crystal Structure of Vinorine Synthase, the First Representative of the BAHD Superfamily. *J. Biol. Chem.* 280:13576–13583
- Maroufi A, van Bockstaele E, de Loose M (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 11:15
- Maruyama IN, Rakow TL, Maruyama HI (1995) cRACE: a simple method for identification of the 5'-end of mRNAs. *Nucleic Acids Research* 23:3796–3797
- Meeks JC (1998) Symbiosis between Nitrogen-Fixing Cyanobacteria and Plants. *BioScience* 48:266–276
- Mehta PK, Hale TI, Christen P (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* 214:549–561
- Mello MO, Silva-Filho MC (2002) Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* 14:71–81
- Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y (2013) Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013:801457
- Michaelis L, Menten ML (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49:333–369
- Milkowski C, Strack D (2004) Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* 65:517–524
- Moffitt MC, Louie GV, Bowman ME, Pence J, Noel JP, Moore BS (2007) Discovery of Two Cyanobacterial Phenylalanine Ammonia Lyases: Kinetic and Structural Characterization. *Biochemistry* 46:1004–1012
- Moglia A, Lanteri S, Comino C, Hill L, Kneve D, Cagliero C, Rubiolo P, Bornemann S, Martin C (2014) Dual catalytic activity of hydroxycinnamoyl-coenzyme A quinate transferase from tomato allows it to moonlight in the synthesis of both mono- and dicaffeoylquinic acids. *Plant Physiol.* 166:1777–1787
- Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, Ohlrogge JB, Pollard M (2009) Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiol.* 151:1317–1328
- Mugford ST, Qi X, Bakht S, Hill L, Wegel E, Hughes RK, Papadopoulou K, Melton R, Philo M, Sainsbury F, Lomonosoff GP, Roy AD, Goss, RJM, Osbourn A (2009) A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *Plant Cell* 21:2473–2484
- Mulder-Krieger T, Verpoorte R, Baerheim Svendsen A, Scheffer J (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 13:85–154
- Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T (2009) Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230:517–527
- Murray IA, Shaw WV (1997) *O*-Acetyltransferases for Chloramphenicol and Other Natural Products. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1–6
- Nair PM, Vining LC (1965) Cinnamic acid hydroxylase in spinach. *Phytochemistry* 4:161–168
- Nakazawa T, Ohsawa K (1998) Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats. *J. Nat. Prod.* 61:993–996

- Niggeweg R, Michael AJ, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.* 22:746–754
- Ober D (2005) Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* 10:444–449
- Obulesu M, Rao DM (2011) Effect of plant extracts on Alzheimer's disease: An insight into therapeutic avenues. *J. Neurosci. Rural Pract.* 2:56–61
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics* 120:621–623
- Otero S, Núñez-Olivera E, Martínez-Abaigar J, Tomás R, Arróniz-Crespo M, Beaucourt N (2006) Effects of cadmium and enhanced UV radiation on the physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *cordifolia*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5:760–769
- Petersen M (1997) Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry* 45:1165–1172
- Petersen M (2003) Cinnamic acid 4-hydroxylase from cell cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis*. *Planta* 217:96–101
- Petersen M (2013) Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochem. Rev.* 12:207–227
- Petersen M (2015) Hydroxycinnamoyltransferases in plant metabolism. *Phytochem. Rev.* DOI: 10.1007/s11101-015-9417-1
- Petersen M, Alfermann AW (1988) Two New Enzymes of Rosmarinic Acid Biosynthesis from Cell Cultures of *Coleus blumei*: Hydroxyphenylpyruvate Reductase and Rosmarinic Acid Synthase. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 43:501–504
- Petersen M, Häusler E, Karwatzki B, Meinhard J (1993) Proposed biosynthesis pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189:10–14
- Petersen M, Häusler E, Meinhard J, Karwatzki B, Gertlowski C (1994) The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 38:171–179
- Petersen M, Metzger JW (1993) Identification of the Reaction Products of Rosmarinic acid Synthase from Cell Cultures of *Coleus blumei* by Ion Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* 4:131–134
- Petersen M, Simmonds MSJ (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62:121–125
- Pierce GJ (1906) *Anthoceros* and Its *Nostoc* Colonies. *Bot. Gaz.* 42:55–59
- Pires ND, Dolan L (2012) Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 367:508–518
- Ponce de León I, Montesano M (2013) Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14:3178–3200

- Prabhu PR, Hudson AO (2010) Identification and Partial Characterization of an L-Tyrosine Aminotransferase (TAT) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Res. Int.* 2010:1–11
- Qiu Y, Li L, Wang B, Chen Z, Knoop V, Groth-Malonek M, Dombrovskaya O, Lee J, Kent L, Rest J, Estabrook GF, Hendry TA, Taylor DW, Testa CM, Ambros M, Crandall-Stotler B, Duff RJ, Stech M, Frey W, Quandt D, Davis CC (2006) The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15511–15516
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20:101–153
- Razzaque A, Ellis BE (1977) Rosmarinic Acid Production in *Coleus* Cell Cultures. *Planta* 137:287–291
- Rensing SA, Ick J, Fawcett JA, Lang D, Zimmer A, Van de Peer, Y, Reski R (2007) An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Evol. Biol.* 7:130
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu S, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer, Y., Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL (2008) The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* 319:64–69
- Renzaglia KS, Duff RJ, Nickrent DL, Garbary DJ (2000) Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 355:769–793
- Reski R (1998) Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses. *Bot. Acta* 111:1–15
- Reski R, Parsons J, Decker EL (2015) Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant Biotechnol. J.* 13:1191–1198
- Reutter K, Reski R (1996) Production of heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 2:142–147
- Ritter H, Schulz G (2004) Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell* 16:3426–3436
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5:69–76
- Rose T, Henikoff J, Henikoff S (2003) CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research* 31:3763–3766
- Rösler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J (1997) Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase Has Tyrosine Ammonia-Lyase Activity. *Plant Physiol.* 113:175–179

- Ruhfel BR, Gitzendanner MA, Soltis PS, Soltis DE, Burleigh JG (2014) From algae to angiosperms-inferring the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *BMC Evol. Biol.* 14:1-27
- Sabovljevic A, Sabovljevic M, Jockovic N (2009) In Vitro Culture and Secondary Metabolite Isolation in Bryophytes. In: Saxena PK, Jain SM (eds) *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 117–128
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequence and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:487–491
- Sander M (2010) Dissertation - Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea*, Philipps-Universität Marburg
- Sander M, Petersen M (2011) Distinct substrate specificities and unusual substrate flexibilities of two hydroxycinnamoyltransferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl-transferase, from *Coleus blumei* Benth. *Planta* 233:1157–1171
- Saxena DK, Harinder (2004) Uses of Bryophytes. *Resonance* 9:56–65
- Scarpati ML, Oriente G (1958) Isolamento e costituzione dell 'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus Off* ). *Ric. Sci.* 28:2329–2333
- Schaefer DG, Zrýd J (2001) The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. *Plant Physiol.* 127:1430–1438
- Scher JM, Zapp J, Becker H (2003) Lignan derivatives from the liverwort *Bazzania trilobata*. *Phytochemistry* 62:769–777
- Schneider K, Hövel K, Witzel K, Hamberger B, Schomburg D, Kombrink E, Stuible H (2003) The substrate specificity-determining amino acid code of 4-Coumarate:CoA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8601–8606
- Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA (2007a) 3'-End cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc* 1:2742–2745
- Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA (2007b) 5'-end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc* 1:2555–2562
- Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari AR, Pirali Hamedani M (2012) Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *pharmacogn Mag.* 8:37–41
- Shen H, Mazarei M, Hisano H, Escamilla-Trevino L, Fu C, Pu Y, Rudis MR, Tang Y, Xiao X, Jackson L, Li G, Hernandez T, Chen F, Ragauskas AJ, Stewart CN, Wang Z, Dixon RA (2013) A genomics approach to deciphering lignin biosynthesis in switchgrass. *Plant Cell* 25:4342–4361
- Shirley AM, McMichael CM, Chapple C. (2001) The sng2 mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. *Plant J.* 28:83–94



- Silber MV, Meimberg H, Ebel J (2008) Identification of a 4-coumarate:CoA ligase gene family in the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* 69:2449–2456
- Sinha P, Singh VK, Suryanarayana V, Krishnamurthy L, Saxena RK, Varshney RK (2015) Evaluation and validation of housekeeping genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (*Cajanus cajan*) under drought stress conditions. *PLoS ONE* 10:e0122847
- Smith EC, Griffiths H (1996) A pyrenoid-based carbon-concentrating mechanism is present in terrestrial bryophytes of the class Anthocerotae. *Planta* 200:203–212
- Sonnante G, D'Amore R, Blanco E, Pierri CL, de Palma M, Luo J, Tucci M, Martin C (2010) Novel Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase Genes from Artichoke Are Involved in the Synthesis of Chlorogenic Acid. *Plant Physiol.* 153:1224–1238
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503–517
- St. Pierre B, de Luca V (eds) (2000) Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Recent Adv. Phytochem.* 34: 285–315
- St. Pierre B, Laflamme P, Alarco A, de Luca V (1998) The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.* 14:703–713
- Stehle F, Brandt W, Milkowski C, Strack D (2006) Structure determinants and substrate recognition of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant secondary metabolism. *FEBS letters* 580:6366–6374
- Stöckigt J, Zenk MH (1975) Chemical Synthesis and Properties of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Derivatives. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 30:352–358
- Strack D (1977) Sinapic acid ester fluctuations in cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 84:139–145
- Strack D (1980) Enzymatic Synthesis of 1-Sinapoylglucose from Free Sinapic Acid and UDP-Glucose by a Cell-Free System from *Raphanus sativus* Seedlings. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 35:204–208
- Strack D, Gross W (1990) Properties and Activity Changes of Chlorogenic Acid:Glucaric Acid Caffeoyltransferase From Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol.* 92:41–47
- Strack D, Gross W, Wray V, Grotjahn L (1987) Enzymic Synthesis of Caffeoylglucaric Acid from Chlorogenic Acid and Glucaric Acid by a Protein Preparation from Tomato Cotyledons. *Plant Physiol.* 83:475–478
- Sullivan ML (2014) Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters. *Planta* 239:1091–1100

- Sullivan ML, Zarnowski R (2011) Red clover HCT2, a hydroxycinnamoyl-coenzyme A:malate hydroxycinnamoyl transferase, plays a crucial role in biosynthesis of phaselic acid and other hydroxycinnamoyl-malate esters in vivo. *Plant Physiol.* 155:1060–1067
- Szövényi P, Frangedakis E, Ricca M, Quandt D, Wicke S, Langdale JA (2015) Establishment of *Anthoceros agrestis* as a model species for studying the biology of hornworts. *BMC Plant Biol.* 15:98–105
- Takeda R, Hasegawa J, Shinozaki M (1990) The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from non-vascular plants, Anthocerotae (Hornworts). *Tetrahedron Lett.* 31:4159–4162
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol. Evol.* 30:2725–2729
- Teutschbein J, Gross W, Nimtz M, Milkowski C, Hause B, Strack D (2010) Identification and localization of a lipase-like acyltransferase in phenylpropanoid metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Biol. Chem.* 285:38374–38381
- Timm S, Nunes-Nesi A, Pärnik T, Morgenthal K, Wienkoop S, Keerberg O, Weckwerth W, Kleczkowski LA, Fernie AR, Bauwe H (2008) A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:2848–2859
- Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie AR (2013) Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in the Green Lineage. *Front. Plant Sci.* DOI: 10.3389/fpls.2013.00062
- Trennheuser F (1992) Dissertation - Phytochemische Untersuchung und in vitro Kultur ausgewählter Vertreter der Anthocerotopsida, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
- Trennheuser F, Burkhard G, Becker H (1994) Anthocerodiazonin, an alkaloid from *Anthoceros agrestis*. *Phytochemistry* 37:899–903
- Troitsky AV, Ignatov MS, Bobrova VK, Milyutina IA (2007) Contribution of genosystematics to current concepts of phylogeny and classification of bryophytes. *Biochem. (Mosc.)* 72:1368–1376
- Tuominen LK, Johnson VE, Tsai C (2011) Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues. *BMC Genomics* 12:236
- Unno H, Ichimaida F, Suzuki H, Takahashi S, Tanaka Y, Saito A, Nishino T, Kusunoki M, Nakayama T (2007) Structural and Mutational Studies of Anthocyanin Malonyltransferases Establish the Features of BAHD Enzyme Catalysis. *J. Biol. Chem.* 282:15812–15822
- Varbanova M, Porter K, Lu F, Ralph J, Hammerschmidt R, Jones AD, Day B (2011) Molecular and biochemical basis for stress-induced accumulation of free and bound p-coumaraldehyde in cucumber. *Plant Physiol.* 157:1056–1066
- Vetter E (1988) Diplomarbeit - Biosynthese der Rosmarinsäure - Enzymatische Untersuchung zur Biosynthese der „Zimtsäure“-CoA-Ester, Eberhard Karls Universität Tübingen

- Villarreal JC, Cargill DC, Hagborg A, Söderström L, Renzaglia KS (2010) A synthesis of hornwort diversity: Patterns, causes and future work. *Phytotaxa* 9:150–166
- Villarreal JC, Renner SS (2012) Hornwort pyrenoids, carbon-concentrating structures, evolved and were lost at least five times during the last 100 million years. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:18873–18878
- Vogelsang K, Schneider B, Petersen M (2006) Production of rosmarinic acid and a new rosmarinic acid 3'-O- $\beta$ -D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton. *Planta* 223:369–373
- Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* 3:2–20
- Walker AM, Hayes RP, Youn B, Vermerris W, Sattler SE, Kang CH (2013) Elucidation of the structure and reaction mechanism of *Sorghum* hydroxycinnamoyltransferase and its structural relationship to other coenzyme A-dependent transferases and synthases. *Plant Physiol.* 162:640–651
- Waters ER (2003) Molecular adaptation and the origin of land plants. *Plant Molecular Evolution* 29:456–463
- Weitzel C (2009) Dissertation - Rosmarinsäure-Biosynthese in Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* L., Philipps-Universität Marburg
- Weitzel C, Petersen M (2010) Enzymes of phenylpropanoid metabolism in the important medicinal plant *Melissa officinalis* L. *Planta* 232:731–742
- Weitzel C, Petersen M (2011) Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry* 72:572–578
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Gen. Biol.* 1:3003.1-3003.9
- Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Carpenter E, Matasci N, Ayyampalayam S, Barker MS, Burleigh JG, Gitzendanner MA, Ruhfel BR, Wafula E, Der JP, Graham SW, Mathews S, Melkonian M, Soltis DE, Soltis PS, Miles NW, Rothfels CJ, Pokorny L, Shaw AJ, DeGironimo L, Stevenson DW, Surek B, Villarreal JC, Roure B, Philippe H, dePamphilis CW, Chen T, Deyholos MK, Baucom RS, Kutchan TM, Augustin MM, Wang J, Zhang Y, Tian Z, Yan Z, Wu X, Sun X, Wong GK, Leebens-Mack J (2014) Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:E4859–E4868
- Xiao Y, Zhang L, Gao S, Saechao S, Di P, Chen J, Chen W, Uversky VN (2011) The c4h, tat, hprr and hppd Genes Prompted Engineering of Rosmarinic Acid Biosynthetic Pathway in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures. *PLoS ONE* 6:e29713
- Xie C, Lou H (2009) Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. *Chem. Biodivers.* 6:303–311
- Xu Z, Zhang D, Hu J, Zhou X, Ye X, Reichel KL, Stewart NR, Syrenne RD, Yang X, Gao P, Shi W, Doeppke C, Sykes RW, Burris JN, Bozell JJ, Cheng Z, Hayes DG, Labbe N, Davis M, Stewart CN, Yuan JS (2009) Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics* 10:S3

Yue J, Hu X, Sun H, Yang Y, Huang J (2012) Widespread impact of horizontal gene transfer on plant colonization of land. *Nat. Commun.* 3:1152 DOI: 10.1038/ncomms2148

Zinsmeiser HD, Becker H, Eicher T (1991) Bryophytes, a Source of Biologically Active, Naturally Occurring Material? *Angew. Chem. Int. Ed.* 30:130–147

## IX. Anhang

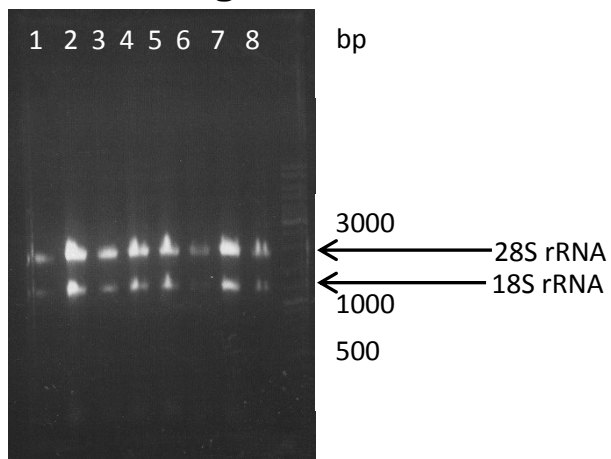


Abbildung 1 Agarose-Gelelektrophorese von RNA Proben 1-8 aus 5 Tage alten *Anthoceros agrestis* Zellen.

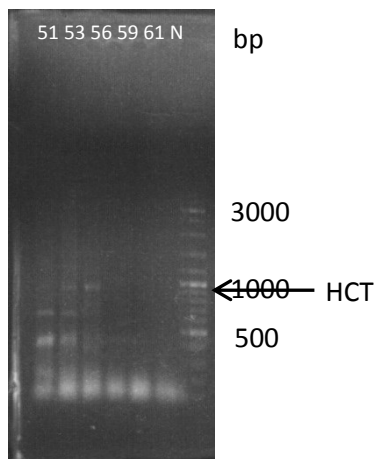


Abbildung 2 Agarose-Gelelektrophorese von PCR von AaHCT mit cDNA Templat und Ac-HCT-f und Ac-HCT-r (Konzentration der Primerlösung 100  $\mu$ M). Gradient 51-61  $^{\circ}$ C, N = Negativkontrolle ohne Templat, erwartet 700 bp, erhalten 860 bp.

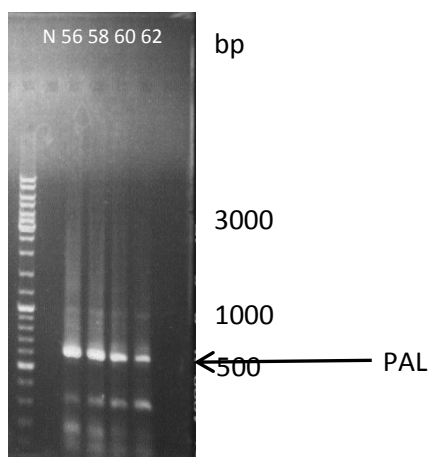


Abbildung 3 Agarose-Gelelektrophorese von nested-PCR von AaPAL mit PCR-Produkt-Templat AcPAL-F2 und AcPAL-R2 (Konzentration der Primerlösung 100  $\mu$ M). Gradient 56-62  $^{\circ}$ C, N = Negativkontrolle ohne Templat, erwartet 600 bp, erhalten 600 bp.

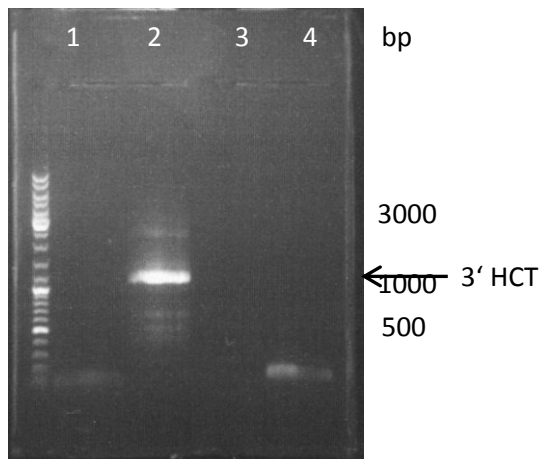


Abbildung 4 Agarose-Gelelektrophorese von 3'- und 5'-RACE PCR von AaHCT nach Scotto-Lavino (Scotto-Lavino et al. 2007a, 2007b). 1: Q<sub>0</sub> und AcHCT\_3GSP1, 2: Q<sub>i</sub> und AcHCT\_3GSP2, 3: Q<sub>0</sub> und AcHCT\_5GSP1, 4: Q<sub>i</sub> und AcHCT\_5GSP2, Konzentration der Primerlösung 10 µM, Temperatur 53 °C.

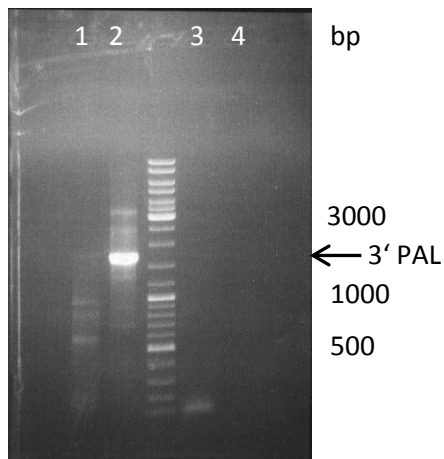


Abbildung 5 Agarose-Gelelektrophorese von 3'- und 5'-RACE PCR von AaPAL nach Scotto-Lavino (Scotto-Lavino et al. 2007a, 2007b). 1: Q<sub>0</sub> und AcPAL-5GSP2, 2: Q<sub>i</sub> und AcPAL-5GSP1, 3: Q<sub>0</sub> und AcPAL-3GSP2, 4: Q<sub>i</sub> und AcPAL-3GSP1, Konzentration der Primerlösung 10 µM, Temperatur 53 °C.

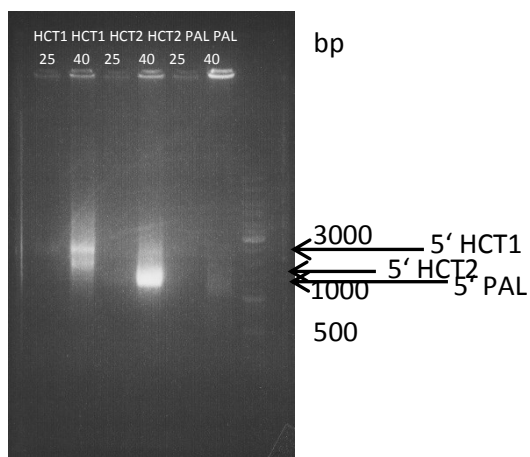
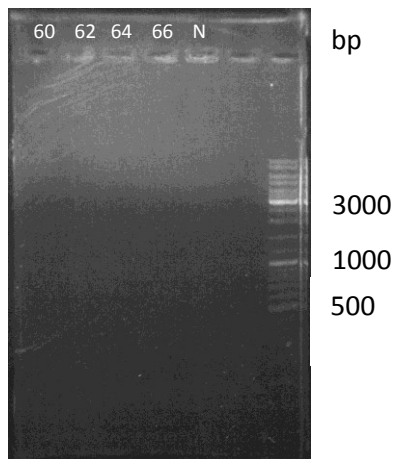
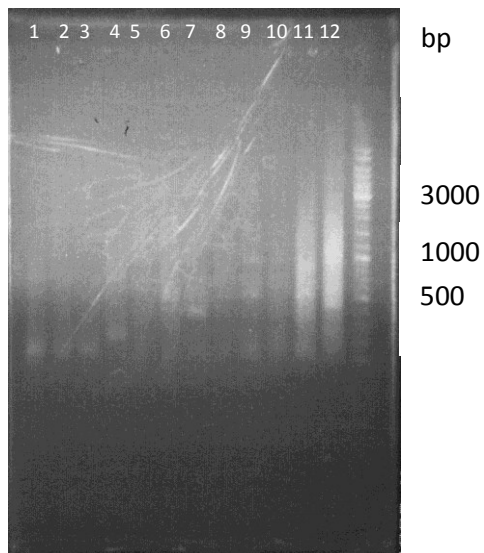


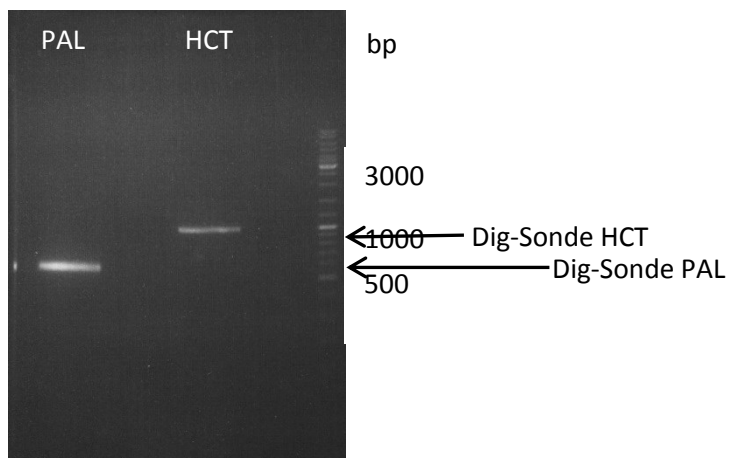
Abbildung 6 Agarose-Gelelektrophorese von SMARTer-RACE PCR von AaHCT1, HCT2 und PAL nach 25 und 40 Zyklen. Konzentration der Primerlösung 10 µM, je USP plus Aa\_5'GSP\_HCT\_1 (HCT1), AaHCT5-GSP2 (HCT2) und Aa\_5'GSP\_PAL (PAL), Temperatur 63 °C.



**Abbildung 7** Agarose-Gelelektrophorese der inversen PCR von AaHCT1 nach Amplifizierung des linearisierten Produkts. Konzentration der Primerlösung 10  $\mu$ M, HCTinv-f und HCTinv-r, Gradient 60-66  $^{\circ}$ C, N = Negativkontrolle ohne Templat.



**Abbildung 8** Agarose-Gelelektrophorese der RAGE-PCR von AaHCT mit gDNA. Konzentration der Primerlösung 100  $\mu$ M,  $Q_i$  und AaHCT5-GSP2, Proben 1-4 nach SmaI-Verdau, 5-8 nach EcoRV-Verdau, 9-12 nach DraI-Verdau, 1, 5, 9: 50  $^{\circ}$ C; 2, 5, 10: 51  $^{\circ}$ C; 3, 7, 11: 53  $^{\circ}$ C; 4, 8 und 12: 56  $^{\circ}$ C.



**Abbildung 9** Agarose-Gelelektrophorese der Digoxigeninsonden von PAL (Konzentration der Primerlösung 10  $\mu$ M, AcPAL-3GSP1 und AcPAL-5GSP1) und HCT (Konzentration der Primerlösung 10  $\mu$ M, AcHCT\_3GSP1 und AcHCT\_5RT). Templat cDNA, Temperatur 57  $^{\circ}$ C.

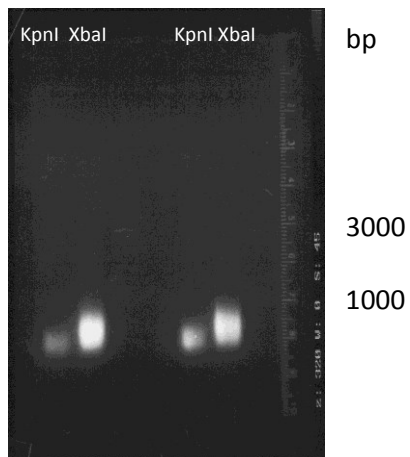


Abbildung 10 Agarose-Gelelektrophorese von je 35 µg gDNA aus *Anthoceros agrestis* nach Restriktionsverdau mit KpnI bzw. XbaI.

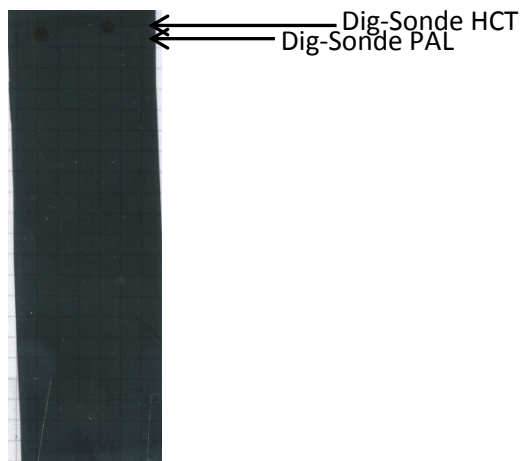
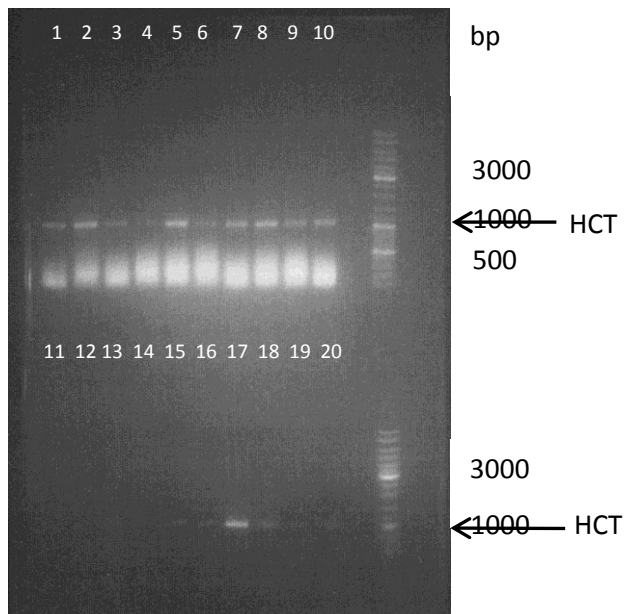


Abbildung 11 Röntgenfilm des Southern Blots der HCT und PAL aus *Anthoceros agrestis* mit Kontrollproben der Dig-Sonden.

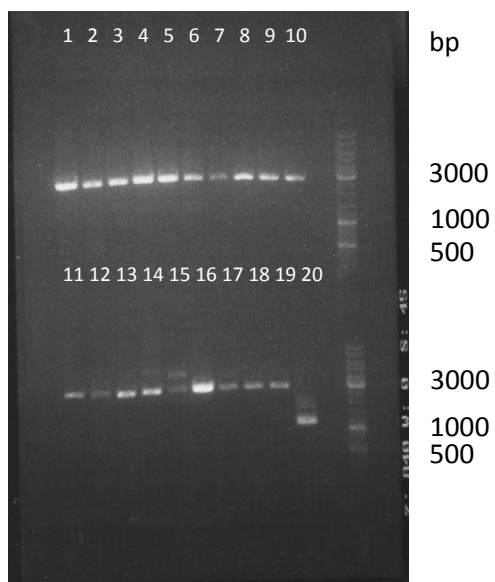


Abbildung 12 Touchdown-PCR Produkte von AaHCT1 aus gDNA nach Restriktionsverdau. Konzentration der Primerlösung 100 µM, AaHCT\_3GSP1 und AaHCT\_5GSP1, 1-8: KpnI-Verdau, 1'-8': XbaI-Verdau, erwartet 1000 bp, erhalten 1000 bp.





**Abbildung 13** Kolonie-PCR von pGEM-4Z[AaHCT1] in *E. coli* Kolonien 1-20. Konzentration der Primerlösung 100  $\mu$ M, AcHCT\_3GSP1 und AcHCT\_5GSP1, erwartet 1000 bp, erhalten 1000 bp.



**Abbildung 14** XbaI-Verdau von pGEM-4Z[AaHCT1] aus *E. coli* Kolonien 1-20.

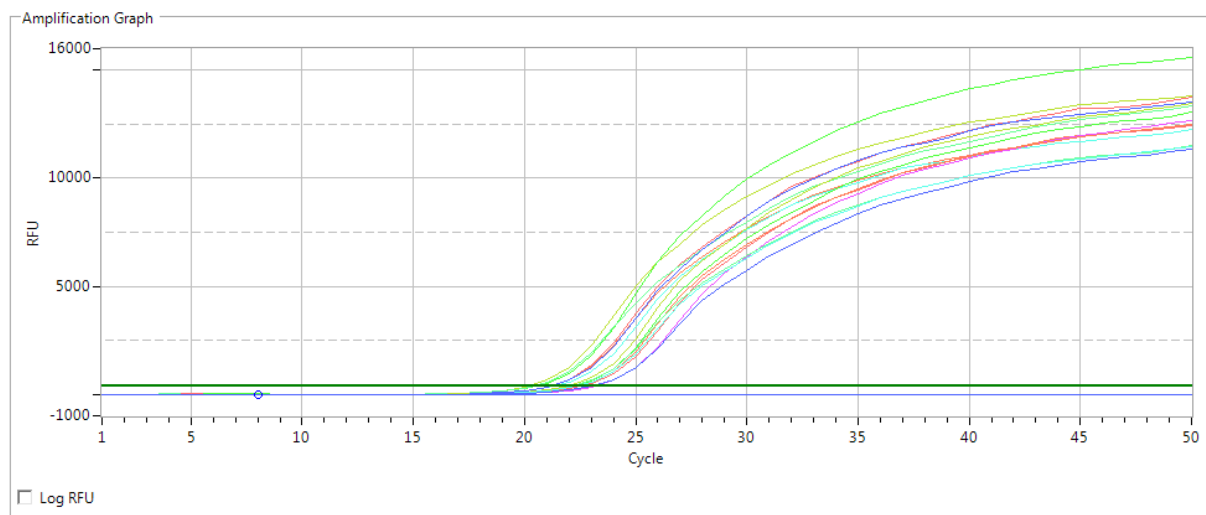


Abbildung 15 qRT-PCR von Actin für Tage 0-14.

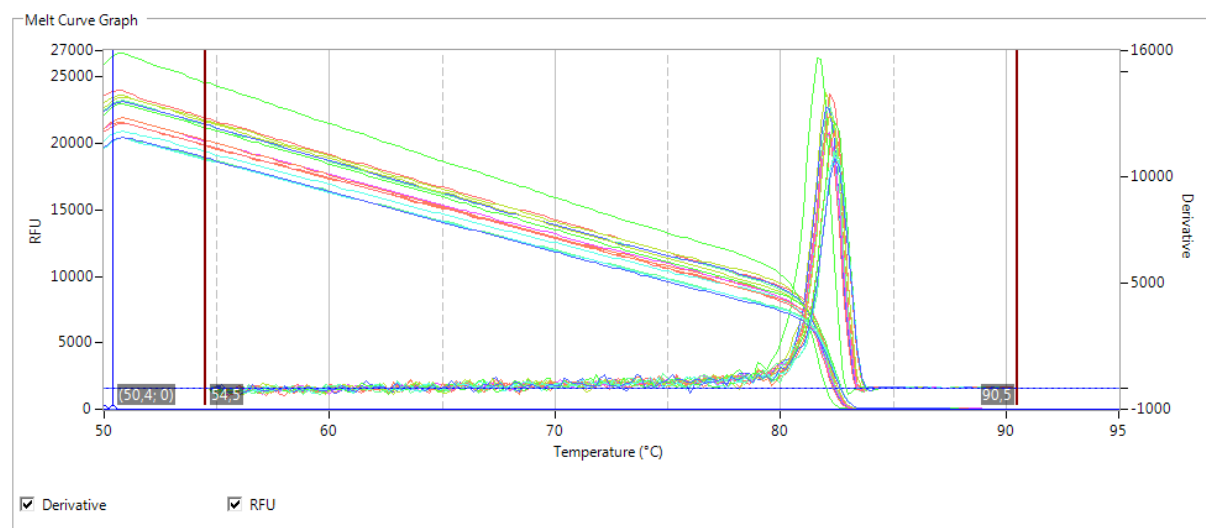


Abbildung 16 Schmelzkurven der qRT-PCR Produkte für die Tage 0-14.

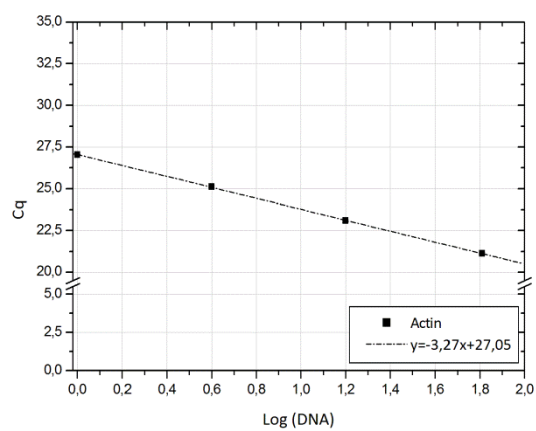


Abbildung 17 qRT-PCR Kalibriergerade für Actin.

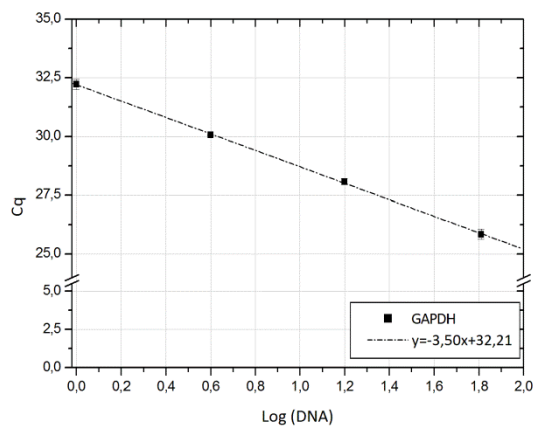


Abbildung 18 qRT-PCR Kalibriergerade für GAPDH.

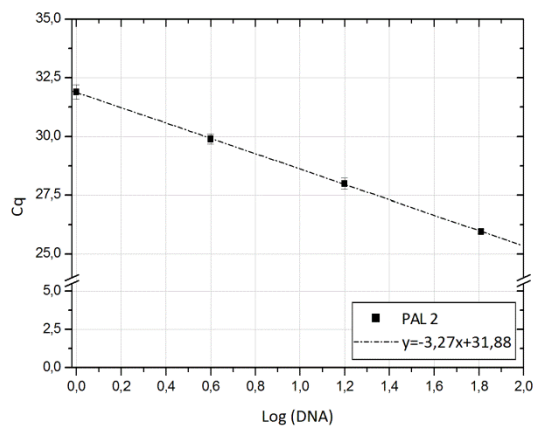


Abbildung 19 qRT-PCR Kalibriergerade für AaPAL2.

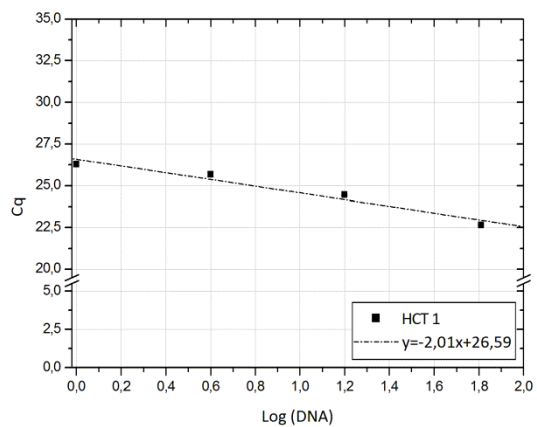
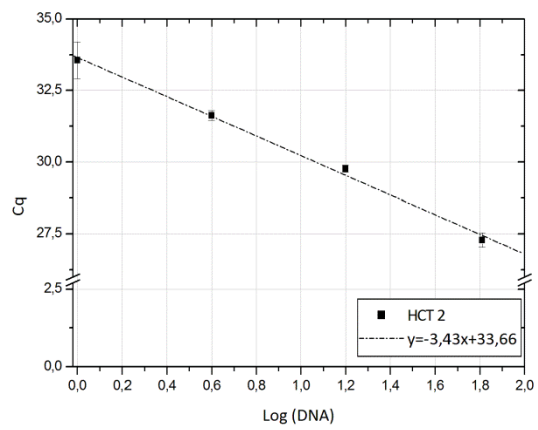
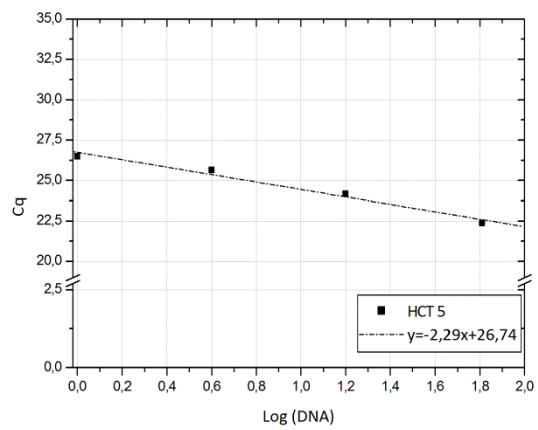


Abbildung 20 qRT-PCR Kalibriergerade für AaHCT1.



**Abbildung 21 qRT-PCR Kalibriergerade für AaHCT2.**



**Abbildung 22 qRT-PCR Kalibriergerade für AaHCT5.**